

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní obor: Biologie
Studijní program: Imunologie



Bc. Lenka Hovorková

Leukemie s fúsním genem BCR/ABL

Leukaemias with BCR/ABL fusion gene

Diplomová práce

Školitel: doc. MUDr. Jan Zuna, Ph.D.

Praha, 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 14.8.2013

Lenka Hovorková

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému školiteli doc. MUDr. Janu Zunovi, Ph.D. za odborné vedení této práce a cenné připomínky, kterými doprovázel mé studium. Jemu i celému kolektivu laboratoře bych také ráda poděkovala za vstřícnost, ochotu a neutuchající trpělivost.

Obsah

1	Abstrakt.....	5
2	Abstract.....	6
3	Seznam zkratk.....	7
4	Úvod.....	9
5	Přehled literatury.....	11
5.1	Philadelphský chromozom.....	11
5.2	Fúzní gen BCR/ABL.....	12
5.3	Léčba.....	14
5.4	Minimální reziduální nemoc.....	16
5.4.1	Průtoková cytometrie.....	18
5.4.2	Klonální přestavby Ig/TCR.....	18
5.4.3	Hladina exprese BCR/ABL mRNA.....	19
5.4.4	Detekce zlomů BCR/ABL na genomické úrovni.....	20
5.5	Clusterování zlomů.....	21
6	Cíle práce.....	22
7	Metody a materiál.....	23
7.1	Použitý biologický materiál.....	23
7.2	Izolace DNA.....	23
7.2.1	Dělení aliquotu na izolaci DNA u pacienta s omezeným množstvím materiálu.....	23
7.2.2	Izolace DNA vysolováním.....	24
7.2.3	Izolace DNA z fenolových fází.....	25
7.3	Stanovení koncentrace DNA.....	27
7.3.1	Stanovení koncentrace DNA na spektrofotometru.....	27
7.3.2	Stanovení koncentrace DNA pomocí kontrolního genu pro albumin.....	27
7.4	Long distance polymerázová řetězová reakce (LD-PCR).....	28
7.4.1	Primery na LD-PCR.....	28
7.4.2	Multiplex PCR.....	30
7.4.3	Kontrolní primery.....	33
7.5	Přečištění vzorku po LD-PCR, sekvenace.....	33
7.6	Analýza výsledků sekvenace a návrh specifických primerů.....	33
7.7	Kvantitativní PCR v reálném čase (RQ-PCR).....	34
7.7.1	Schéma RQ PCR.....	35
7.7.2	SYBR Green RQ PCR.....	35
7.7.3	RQ PCR s využitím hydrolyzační TaqMan sondy.....	36
7.8	Pravidla pro kvantifikaci MRN.....	36
7.9	Měření MRN na základě přestaveb pro Ig/TCR.....	38
7.9.1	Agilent 2100 Bioanalyzer.....	39
7.9.2	Příprava pacient-specifických primerů a měření MRN.....	40
7.10	Měření MRN na základě hladiny BCR/ABL mRNA.....	41
7.10.1	Izolace celkové RNA z leukocytů modifikací dle Trizolu.....	41
7.10.2	Reverzní transkripce.....	43
7.10.3	Měření exprese kontrolního genu pro glukuronidázu (GUS) a genu pro BCR/ABL.....	43
7.11	Konečné stanovení MRN na základě výsledků RQ-PCR.....	44
7.12	Analýza oblasti zlomů.....	44
8	Výsledky.....	45
8.1	Detekce zlomů a měření MRN.....	45
8.1.1	Major oblast.....	45

8.1.2	Minor oblast.....	47
8.2	Clusterování zlomů	49
9	Diskuze	51
10	Závěr	54
11	Seznam použité literatury	56

1 Abstrakt

Philadelphský (Ph) chromozom je chromozomální aberací, která je nejčastěji spojována s chronickou myeloidní (CML) a akutní lymfoblastickou (ALL) leukémií. Zlomý vedoucí ke vzniku této reciproké translokace vznikají v dlouhých intronových oblastech genů BCR a ABL. Nově vzniklé přechodové oblasti jsou u každého pacienta jedinečné a otevírají tak možnost pro detekci minimální reziduální nemoci (MRN). MRN by měla přinášet informaci o množství leukemických buněk v organismu v průběhu léčby, je důležitým prognostickým faktorem a má vliv na intenzitu léčby. V současné době jsou k tomuto monitoringu využívány dvě standardizované metody. Jsou jimi detekce klonálních přestaveb genů pro Imunoglobuliny a/nebo T-buněčné receptory na genomické úrovni a detekce fúzního genu BCR/ABL na mRNA úrovni. První ze zmíněných metod není v praxi využitelná pro CML pacienty, kteří mají primárně postižené myeloidní buňky, které imunoreceptorové geny nepřestavují.

Naším cílem bylo optimalizovat a standardizovat metodu hledání BCR/ABL zlomů na genomické úrovni a využít těchto přechodových sekvencí ke stanovení MRN.

Podařilo se nám nalézt přechodovou sekvenci v 80 % případů. Při srovnání hodnot naměřených námi zavedenou metodou s hodnotami získanými standardně byla nalezena perfektní korelace pouze u 1 pacienta. U zbylých 14 pacientů byly patrné rozpory v naměřených hodnotách. Tento nesoulad ukazuje na dosud nevyřešené otázky původu leukemických buněk a metodologicky nejvhodnějšího měření MRN.

Provedli jsme i analýzu míst zlomů a přechodových sekvencí. Naše výsledky se shodují s již dříve publikovanými daty, neukazují na clusterování zlomů a na jejich základě nelze ani určit přesný mechanismus vzniku Ph chromozomu.

Klíčová slova:

Chronická myeloidní leukémie, akutní lymfoblastická leukémie, minimální reziduální nemoc, BCR/ABL, Ig/TCR přestavby, kvantitativní PCR v reálném čase

2 Abstract

Philadelphia (Ph) chromosome, as a result of reciprocal translocation, is in majority of cases connected to two types of leukaemia – chronic myelogenous (CML) and acute lymphoblastic (ALL). The translocation occurs within large intronic sequences of BCR and ABL genes. The breakpoints are specific for individual patient and may be used as a target for monitoring of leukemic burden (MRD, minimal residual disease) during the treatment. In general, MRD is an important prognostic factor, which influences the treatment intensity. Two standardized methods are currently used for its monitoring. The first one is based on the detection of clonal specific Immunoglobulin and/or T-cell receptor genes rearrangements (and thus cannot be used for CML cases) at the DNA level, the second one utilizes detection of the BCR/ABL fusion gene at the mRNA level.

Our aim was to optimize and standardize the process to find individual patient breakpoints on Ph chromosome and to use it for MRD quantification.

We found the breakpoint in 80 % cases. The MRD data from 15 patients obtained by our method were compared to the levels obtained by standard methods (Ig/TCR and BCR/ABL transcript quantification). In all but 1 patient we found significant discrepancies, raising the questions about leukemic origin and the most accurate method for MRD assessment.

Moreover, we analysed the breakpoint regions. Our results are compatible with previously reported data and do not show neither clustering nor the precise mechanism of the breakpoint origin.

Key words:

Chronic myelogenous leukaemia, Acute lymphoblastic leukaemia, Minimal residual disease, BCR/ABL, Ig/TCR genes rearrangement, quantitative real time PCR

3 Seznam zkratek

ABL	Abelsonův gen myší leukémie
ALL	Akutní lymfoblastická leukémie
ASO	Allele-specific oligomer
β2M	Beta 2 mikroglobulin
BCR	Breakpoint cluster region
BSA	Bovinní serum albumin
cDNA	Complementary DNA (komplementární DNA)
Ct	Cycle treshold
CDR	Complementarity determining region
DFS	Disease free survival (Období bez nemoci)
DNA	Deoxyribonucleic acid (Deoxyribonukleová kyselina)
EFS	Event free survival (Období bez události)
EsPhALL	European Intergroup study on post-induction treatment of Ph ⁺ ALL
gDNA	Genomická DNA
GMALL	German Multicentre ALL Working Group
GUS	Glukuronidáza
HR	High risk block
HSCT	Hematopoietic stem cell transplantation (Transplantace hematopoetických kmenových buněk)
Ig	Imunoglobulin
IgH	Ig Heavy chain (těžký řetězec Ig)
IgK	Ig Kappa (Kappa lehký řetězec Ig)
ITG	Guanidium isothyokyanát
LD-PCR	Long distance PCR
LINE	Long interspersed nuclear elements
LSC	Leukemic stem cell (Leukemická kmenová buňka)
MRN	Minimální reziduální nemoc
mRNA	Messenger RNA (Mediátorová RNA)
NHEJ	Nonhomologous end joining (Nehomologní spojování konců)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerázová řetězová reakce)
Ph	Philadelphský chromozom
RAG	Recombination activating enzyme

RSS	Recombination signal sequences
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleová kyselina)
RQ-PCR	Real time quantitative PCR (kvantitativní PCR v reálném čase)
SDS	Sodium dodecylsulfate (Dodecil sulfát sodný)
SINE	Short interspersed nuclear elements
TCR	T-cell receptor (T-buněčný receptor)
TKI	Tyrosin kinase inhibitor (Tyrozin kinázový inhibitor)
V(D)J	Variable (Diversity) Joining

4 Úvod

Leukémie je onemocnění postihující leukocyty, jejich prekurzory či dokonce hematopoetické kmenové buňky. Zásadním problémem maligních projevů leukémií ani tak není zrychlená proliferace ("doubling-time" leukemických buněk může být u řady podtypů dokonce delší než je tomu u zdravých lymfocytů), ale diferenciační blok, kdy buňky nedozrávají do svých finálních stádií a neplní tak své fyziologické funkce, a fakt, že leukemické buňky tím ztrácí i schopnost odpovídat na apoptotické signály. V organismu tudíž přetrvávají déle, než buňky zdravé, a časem jejich množství převyší množství fyziologických, funkčních leukocytů.

Od konce 19. století, kdy byla leukémie poprvé popsána, se její prognóza dramaticky zlepšila. Již se nejedná o jednoznačně nevyléčitelné onemocnění, léčebné výsledky se však liší mezi jednotlivými typy leukémií. Ty jsou v obecném měřítku čtyři – s ohledem na postiženou vývojovou linii *myeloidní* a *lymfoidní*; s přihlédnutím k rychlosti progresu onemocnění se jedná o rozdělení na *akutní* a *chronickou*. Ve své práci se budu zabývat dvěma z nich – chronickou myeloidní a akutní lymfoblastickou leukémií. Chronická myeloidní leukémie (CML) patří mezi hematologickými malignitami k onemocněním s lepší prognózou – šestileté přežití bez události (EFS; *Event free survival*) je přes 80 % (Hochhaus, *et al* 2009), o něco hůře jsou na tom pacienti s akutní lymfoblastickou leukémií (ALL)(u dětských pacientů je desetiletý EFS 70-80% (Sary, *et al* 2010), u dospělých pacientů je prognóza ještě horší, 3 letý EFS se pohybuje kolem 50 % (Bruggemann, *et al* 2006). Avšak vzhledem k tomu, že se jedná o velice heterogenní onemocnění, různé geneticky definované podskupiny ALL mají různou prognózu. Mezi podskupiny s nejhorší prognózou patří pacienti s chromozomální aberací – Philadelphským chromozomem.

Chromozomální aberace v leukemických buňkách patří mezi důležité prognostické faktory (Moorman, *et al* 2007) a přítomnost některých z nich má přímý vliv na volbu intenzity terapie. V léčebných protokolech je však lze kromě diagnostiky využít i ke stanovování *minimální reziduální nemoci* (MRN), která informuje o zastoupení maligních buněk v kostní dřeni či krvi pacienta v průběhu léčby. Pokud se k monitorování léčebné odpovědi využívají fúzní geny, hladina MRN se nejčastěji stanovuje pomocí kvantifikace transkriptů, neděje se tak tedy přímo na genomické úrovni.

Další zajímavou součástí studia na poli aberantních chromozomů je zjišťování mechanismu jejich vzniku. Hledají se souvislosti mezi sekvencemi, ve kterých dochází ke

zlomům, a sekvencemi, které jsou rozpoznávány například RAG rekombinázami. Je totiž možné, že v závislosti na typu onemocnění mohou vznikat zlomy různými mechanizmy (RAG rekombinázy vs nehomologní spojování konců (NHEJ, *Nonhomologous end joining*;). V souvislosti se vznikem Philadelphského chromozomu jsou zmiňovány i transpozonální *Alu* sekvence, jež jsou rozpoznávány endonukleázou Alu I.

5 Přehled literatury

5.1 Philadelphský chromozom

Philadelphský (Ph) chromozom je historicky první chromozomální aberací, která je spojována s maligní transformací leukocytů (Nowell and Hungerford 1960). Jedná se o reciprokou translokaci dlouhého raménka chromozomu 9 na dlouhé raménko chromozomu 22; takto vzniklý chromozom je tedy označován jako t(9;22)(q34;q11). Původně byl Ph chromozom spjat s chronickou myeloidní leukémií. CML postihuje především dospělou populaci a její incidence roste s věkem cílové populace (An, *et al* 2010, Suttorp and Millot 2010). Jak název napovídá, CML je onemocněním projevujícím se postižením především buněk myeloidní řady, nicméně v určitém okamžiku může dojít k projevům patologie i v lymfoidní vývojové linii. Stává se tak v období tzv. blastické krize, kdy dojde k výraznému navýšení procentuálního zastoupení blastů (a to buď lymfoidních, nebo myeloidních – odtud pak je blastická krize označována jako lymfo- respektive myelo- blastická) v periferní krvi či kostní dřeni pacienta. Často se CML klinicky projeví až v tomto období. V případě, že jsou v blastické krizi postiženy buňky myeloidní linie, není diagnostika problematická (i když byly popsány i případy Ph⁺ akutní myeloidní leukémie (Nacheva, *et al* 2013, Soupir, *et al* 2007). Pokud však je postižena lymfoidní linie, vyvstává otázka, zda se jedná o CML v blastické krizi, či zda je pacient postižen jiným typem leukémie, a to akutní lymfoblastickou leukémií. ALL je druhým nejčastějším typem neoplázie krvetvorných buněk, který je spojován s Ph chromozomem. Zatímco však pro CML je tato chromozomální aberace charakteristickým markerem a naprostá většina pacientů s CML má typický Ph chromozom (u ostatních může být translokace kryptická nebo spojená s dalšími změnami (O'Brien, *et al* 1997, Virgili, *et al* 2008)), u ALL tvoří Ph⁺ pacienti jen menší část (mezi dětskými pacienty se jedná o 3 – 5 % (Cazzaniga, *et al* 2002), s věkem četnost těchto leukémií stoupá a u dospělých představuje přibližně 20 – 30 % pacientů s ALL (Dombret, *et al* 2002, Moorman, *et al* 2007, Pane, *et al* 2005, Rowe, *et al* 2005). V České republice jsou každý rok diagnostikovány s Ph⁺ ALL 2 – 3 děti a přibližně 20 dospělých, s CML je diagnostikováno přibližně 100 dospělých a u dětí je toto onemocnění vzácné (asi 1 – 2 případy za rok).

I přes někdy obtížnou diagnostiku je však důležité obě onemocnění od sebe odlišit. Oba typy leukémií mají odlišnou prognózu (Ph⁺ ALL je agresivnějším onemocněním) a z klinického hlediska se tedy liší způsobem léčby. V hledáčku vědeckých pracovníků je tedy znak, na jehož základě by došlo k jednoznačné diagnóze.

Jednou z možností je vyšetření myeloidních buněk – zatímco u CML by tyto buňky měly být Ph⁺, u ALL by myeloidní řada neměla být postižena. Nicméně, několik prací zaměřených na tuto problematiku ukázalo, že i u pacientů s diagnózou ALL lze najít myeloidní buňky s aberantním chromozomem (Castor, *et al* 2005, Cuneo, *et al* 1994, Pajor, *et al* 2000, Schenk, *et al* 1998). Tyto studie ukazují, jak obtížné je obě varianty onemocnění od sebe odlišit. Řešení se nabízí i na molekulární úrovni – předpokládalo se, že u pacientů s CML dochází ke vzniku zlomů na 22. chromozomu v jiné oblasti než je tomu u pacientů s ALL (v "Major" respektive "minor" oblasti, viz dále). Avšak ani toto rozlišení neplatí absolutně.

5.2 Fúzní gen BCR/ABL

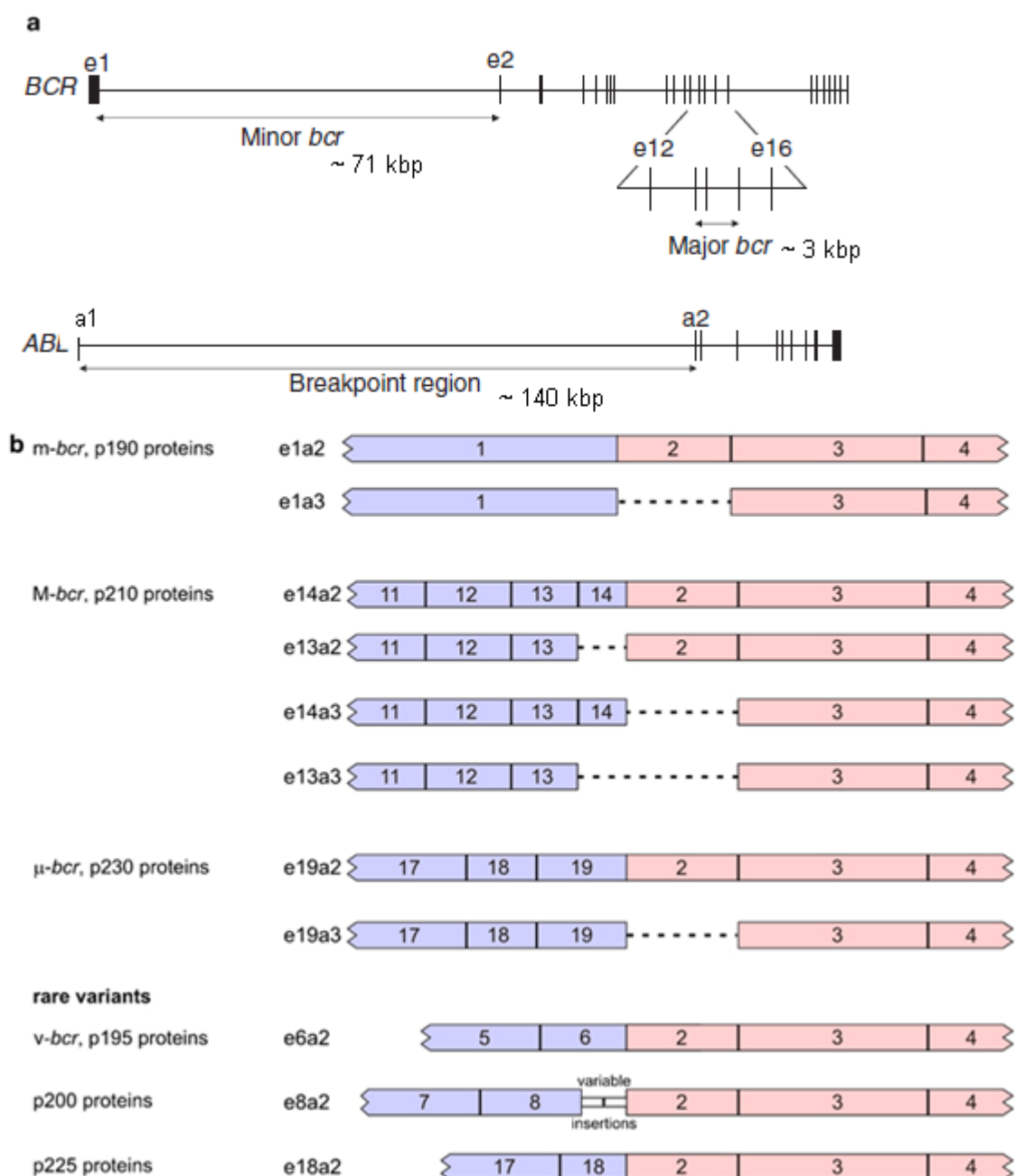
Výše popsanou reciprokou translokací t(9;22)(q34;q11) dochází ke vzniku fúzního genu, jenž po transkripci a následné translaci dává vzniknout konstitutivně aktivní tyrozin kináze. Tento protein může mít nejméně tři podoby, neboť na 22. chromozomu může ke zlomu dojít ve třech oblastech genu BCR (*Breakpoint cluster region*). Naproti tomu, na chromozomu 9 dochází ke zlomu pouze v jedné cca 141 kbp dlouhé oblasti genu homologického s Abelsonovým virem myší leukémie (ABL) a to před exonem a2, vzácně až před exonem a3 (Inukai, *et al* 1993, Jaso, *et al* 2011, Soekarman, *et al* 1990). Nově vzniklý fúzní gen má na svém 5' konci část genu pro BCR, 3' konec patří části genu pro ABL.

V proximální části genu BCR, mezi exonem 1 a exonem 2, leží oblast označovaná jako *minor* BCR. Jedná se o rozsáhlou intronovou sekvenci o velikosti přibližně 71 kbp. Dojde-li ke zlomu v této oblasti, bude mRNA pro takto vzniklý gen obsahovat exon e1 genu BCR a exony 2 (3) - 11 genu ABL. Translací takovéto mRNA vzniká protein o velikosti 190 kDa - odtud pochází i jeho označení „p190“. Zlomy v *minor* oblasti jsou typické pro pacienty s Ph⁺ ALL (Schrappe, *et al* 1998, Yanada, *et al* 2008).

Druhou oblastí genu BCR, ve které dochází ke vzniku zlomů, je úsek ohraničený exony 13 a 15 (dříve byly označovány jako b2 až b4). Tato část genu BCR je označována jako *Major* oblast a svým rozsahem je výrazně menší než *minor* oblast – je reprezentována přibližně 3 kbp. Jsou popsány dvě základní varianty mRNA pro vznik zlomů v *Major* oblasti, nejčastěji vzniká mRNA se spojením b2a2 (BCR exon 13/ABL exon 2) či b3a2 (BCR exon 14/ABL exon 2). Oba tyto transkripty kódují protein o velikosti 210 kDa (označení proteinu je tedy p210) (viz Obrázek 1). Tento typ zlomů je příznačnější pro pacienty diagnostikované s CML (Adler, *et al* 2009, van Dongen, *et al* 1999). U pacientů se

zlomy v *Major* oblasti jsou často nacházeny i mRNA s exonovým spojením e1a2, tedy minor-BCR/ABL, patrně díky alternativnímu sestřihu pre-mRNA (van Rhee, *et al* 1996).

Oblast zlomů nejdál od 5' konce genu BCR je označována jako μ -BCR a nachází se za exonem 19. Překladem nově vzniklé mRNA vzniká protein o velikosti 230 kDa (p230). Tento typ zlomů je asociován se vzácnými případy Ph^+ chronické neutrofilní leukémie (Pane, *et al* 1996).



Obrázek 1: **a** - oblasti zlomů v genu BCR a ABL převzato a upraveno dle (Score, *et al* 2010) ; **b** - varianty fúzních transkriptů, převzato z (Weerkamp, *et al* 2009).

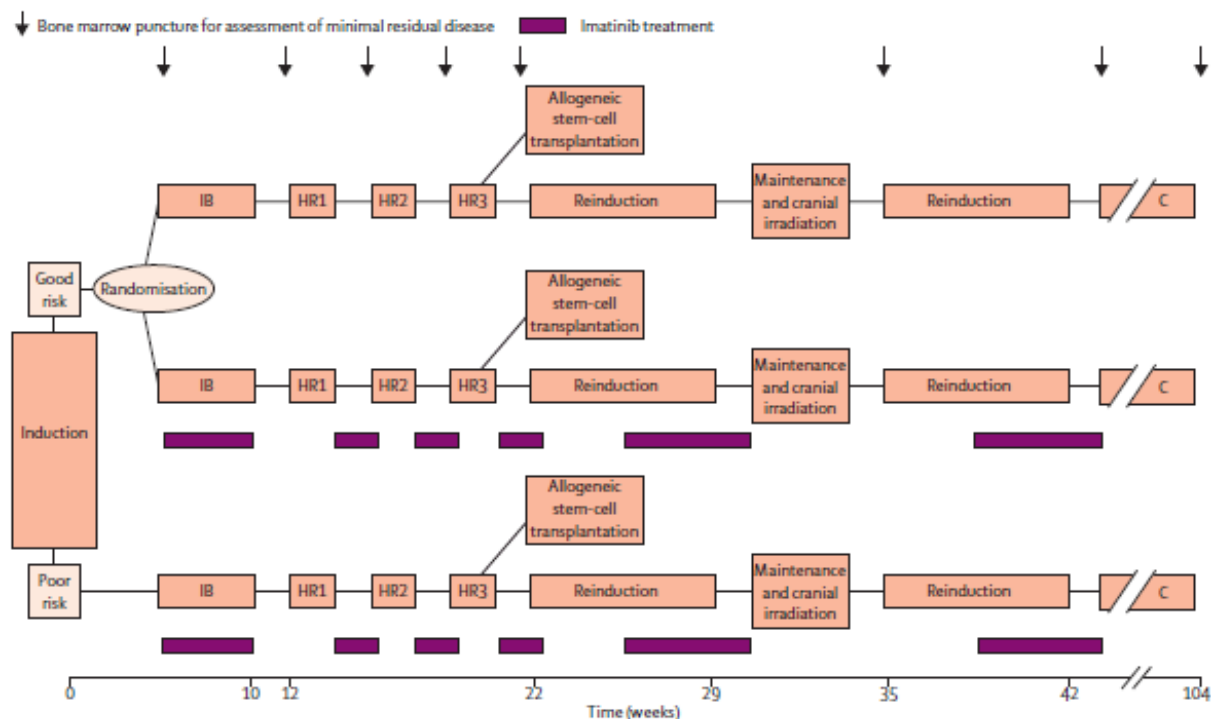
5.3 Léčba

U pacientů s chronickou myeloidní leukémií se již od roku 2001 k léčbě využívá tyrozín kinázového inhibitoru (TKI) známého jako imatinib mesylate. CML je poměrně snadno zvládnutelná terapií, ocitá-li se pacient v chronické fázi. Prognóza pro pacienty ve zrychlené fázi již natolik příznivá není a s přechodem do fáze blastické krize se ještě zhoršuje. Podáváním imatinibu se prognóza pro pacienty s CML vylepšila (pravděpodobnost 3 letého přežití pro jednotlivé skupiny (chronická fáze – akcelerovaná fáze – blastický zvrát) je 95 %, 65 % respektive 16 %) (Cortes, *et al* 2006, Kantarjian, *et al* 2002a, Kantarjian, *et al* 2002b, O'Brien, *et al* 2003). Imatinib je v rámci léčby podáván kontinuálně až do případné transplantace hematopoetických kmenových buněk. Intenzita léčby imatinibem či přechod na jiný TKI je závislý na fázi a progresi onemocnění (Baccarani, *et al* 2013, Faber, *et al* 2011, Suttorp and Millot 2010)

Pacienti trpící akutní lymfoblastickou leukémií jsou stratifikováni v rámci léčebného protokolu do různých léčebných ramen na základě typu postižených blastů, přítomných rizikových faktorech a odpovědi na terapii v prvních týdnech léčby. Ph⁺ ALL případy patří mezi nejrizikovější skupinu pacientů a jsou tedy automaticky řazeni do léčebného ramene, označovaného jako vysoce rizikové (5 letý EFS a celkové přežití pro dospělé Ph⁺ pacienty je 16 respektive 22 % a pro Ph⁻ pacienty 36 respektive 41 % (Moorman, *et al* 2007)). Pediatrické případy ALL jsou v České republice léčeny kombinací chemoterapeutik podle protokolu AIEOP-BFM (Berlin – Frankfurt – München). Do nedávna byli i pacienti s Ph⁺ ALL zařazováni do tohoto protokolu. S objevem imatinibu a jeho převratným přínosem při léčbě CML se tento TKI začal objevovat i jako součást terapie Ph⁺ ALL. V současné době probíhá velká mezinárodní studie EsPhALL (European Intergroup study on post-induction treatment of Ph⁺ ALL) zahrnující dětské pacienty, která zpočátku porovnávala výsledky této nové léčby s léčbou standardní (bez imatinibu). V tomto protokolu byli pacienti rozřazeni do dvou ramen – *good risk* a *poor risk*, a to na základě odpovědi na léčbu během indukce (viz Obrázek 2). Nedávno publikované výsledky ukázaly na lepší léčebné výsledky při léčbě imatinibem i v rámci *good risk* ramene (pravděpodobnost 4 letého přežití bez nemoci (DFS, *Disease free survival*) je 75,2 % vs 55,9 % při léčbě s imatinibem, respektive bez imatinibu (Biondi, *et al* 2012)) a proto jsou na nové verzi protokolu k léčbě imatinibem indikováni již všichni Ph⁺ pacienti.

Dospělí pacienti s Ph⁺ ALL jsou v České republice léčeni podle protokolu GMALL (*German Multicentre ALL Working Group*), do něhož jsou zařazeni všichni ALL pacienti.

Imatinib je Ph⁺ pacientům podáván již od šestého dne léčby paralelně s chemoterapií. Léčba imatinibem probíhá kontinuálně až do transplantace hematopoetických kmenových buněk (HSCT), ke které jsou tito pacienti indikováni. Čtyřleté celkové přežití pro pacienty léčené v rámci GMALL protokolu dosahuje 50 % (Pfeifer, *et al* 2010).



Obrázek 2 Stratifikace pacientů v rámci protokolu EsPhALL. Převzato z Biondi, *et al* 2012; HR – High risk block; C – konsolidační terapie, IB – Indukční terapie

Vzhledem k tomu, že pacienti s Ph⁺ ALL patří mezi nejrizikovější skupinu, byla dlouhou dobou jediným terapeuticky osvědčeným přístupem právě transplantace hematopoetických kmenových buněk během remise onemocnění. V současné době se zdá, že díky zavedení imatinibu (a dalších generací TKI, které jsou účinné proti některým variantám s mutací v ABL kinázové doméně rezistentním na léčbu imatinibem) do klinické praxe není HSCT jedinou možností léčby. Kontinuální používání imatinibu přináší z dlouhodobého hlediska podobné výsledky jako HSCT (Yanada, *et al* 2006).

Jak bylo uvedeno výše, ALL pacienti jsou do rizikových skupin řazeni podle faktorů, jakými je např. množství bílých krvinek v krvi, věk, nebo přítomnost chromozomální aberace. S nástupem molekulárně biologických metod vstoupila na scénu i možnost detekce minimální reziduální nemoci. Protože bylo přesvědčivě prokázáno, že hladina MRN v konkrétních dnech léčby má prognostický význam, jsou i hladiny MRN používány pro rozdělování pacientů do rizikových skupin.

5.4 Minimální reziduální nemoc

Výsledkem měření minimální reziduální nemoci je informace o množství zbývajících leukemických buněk v pacientově kostní dřeni či periferní krvi v průběhu léčby, zejména na jejím začátku, v prvních týdnech a měsících.

Stejně jako u ostatních ALL i u Ph⁺ pacientů jsou hodnoty MRN důležitým ukazatelem prognózy – pacienti, kteří dobře odpovídají na léčbu a dosáhnou časně remise onemocnění, mají významně lepší prognózu než ti s odpovědí špatnou. Pane a jeho spolupracovníci popisují pravděpodobnost 2letého přežití pro jednotlivé skupiny u dospělých pacientů 48 % a 0 % (Pane, *et al* 2005), podobné výsledky byly prezentovány i pediatrickými pracovními skupinami (Arico, *et al* 2000, Cazzaniga, *et al* 2002, Schrappe, *et al* 1998). Tato data však pocházejí z dob, kdy do protokolů nebyl zařazen kinázový inhibitor.

Protokol EsPhALL je nový terapeutický protokol vytvořený pro léčbu dětské Ph⁺ ALL, založený na podávání kinázových inhibitorů, a vychází z léčebného protokolu AIEOP-BFM, do jehož vysoko rizikového ramene byli dříve dětské pacienti zařazováni. Mezi výzkumné cíle této studie patří i otázka, které měření MRN v průběhu léčby (pokud nějaké) má prognostickou hodnotu, které naznačí další průběh onemocnění a na jehož základě by mohla nebo měla být léčba upravena. Některé studie již naznačily, že v současné éře TKI nemusí platit stejná pravidla pro hodnocení dat MRN u Ph⁺ ALL pacientů. Některé práce ukazují, že pacienti rozdělení podle odpovědi na léčbu (dobrá vs. špatná, podle toho, jak rychle dosáhli kompletní remise onemocnění) dle „starých“ stratifikačních MRN pravidel, se svou prognózou v dlouhodobém měřítku prakticky neliší (de Labarthe, *et al* 2007, Yanada, *et al* 2008). Využití TKI totiž obecně zvýšilo pravděpodobnost dosažení remise onemocnění (Biondi, *et al* 2012). Taktéž bylo ukázáno, že ani dlouhodobě nízká hladina MRN nemusí nutně znamenat relaps onemocnění (Bohm, *et al* 2011). Jedním z návrhů pro změnu měření MRN bylo častější odebírání krevních vzorků v době remise onemocnění. Bylo ukázáno, že i když k časnějšímu a rychlejšímu nárůstu detekovatelných leukemických buněk dochází ve vzorcích kostní dřeni, zvýšení hladiny BCR/ABL v periferní krvi může mít lepší prediktivní hodnotu a navíc je možno periferní krev odebírat v kratších časových odstupech. Častější odběry by tedy mohly dříve detekovat hrozící relaps onemocnění (Scheuring, *et al* 2003).

Poznatky o MRN pocházející z éry TKI se nejčastěji dávají do souvislosti s výsledkem HSCT. U pacientů s Ph⁺ ALL byla HSCT dlouho považována za jedinou možnost vedoucí k vyléčení. I když i na tomto poli došlo ke změnám a post transplantační mortalita je

srovnatelná s mortalitou pacientů, kteří jsou dlouhodobě léčeni imatinibem či TKI druhé generace (nilotinib, dasatinib). Pacienti, kteří mají měřitelné hladiny MRN a podstoupí HSCT, mají vyšší riziko relapsu onemocnění, než negativní pacienti (pre-imatinibové období (Knechtli, *et al* 1998, Sramkova, *et al* 2007)). Na základě výsledků MRN je tedy možné upravit léčbu a podstoupit HSCT až po dosažení negativních výsledků MRN (Burke, *et al* 2012). Post transplantační měření hladiny MRN má rovněž svůj klinický význam a na jeho základě může být upravována imunoterapie a započato s opětovným podáváním TKI (Chen, *et al* 2012, Wassmann, *et al* 2005).

Sledování dospělých pacientů s Ph⁺ ALL ukázalo, že důležitým prognostickým faktorem pro výsledek HSCT je celková kinetika MRN, nikoliv pouze její hodnoty v počátečních měřeních (Lee, *et al* 2012).

Pacienti trpící CML mají obecně lepší prognózu, dokud se ocitají v chronické fázi. Imatinib svými účinky pomohl nejen prodloužit právě období remise či chronické fáze, ale i vylepšit prognózu pro pacienty v období blastické krize a umožnit návrat do fáze chronické či do remise onemocnění. I u těchto pacientů se provádí měření MRN a i zde má svůj prognostický význam. U CML pacientů nebyla pozorována změna v prognostických vlastnostech MRN vzhledem k podávání imatinibu. Požadavek na individuální a přesné monitorování MRN u CML pacientů má v současné době poněkud jiné pozadí než je tomu u Ph⁺ ALL pacientů. Na základě výsledků MRN jsou pacienti stratifikováni do skupin s odlišnou prognózou (Baccarani, *et al* 2009). Navíc lze díky monitorování MRN sledovat nárůst počtu leukemických buněk (a hrozící možný relaps či přechod do akcelerované fáze) a je tedy možné včas zintenzivnit či změnit léčbu tyrozin kinázovými inhibitory (Baccarani, *et al* 2013). V posledních letech se objevují snahy o přerušení léčby tyrozin kinázovými inhibitory, navzdory hrozícímu riziku relapsu onemocnění. Kompromisním řešením se zdá být střídavá/přerušovaná léčba u pacientů s dlouhodobými negativními hladinami MRN. Doposud byli takto léčeni jen starší pacienti (> 65 let), autoři studie se však zdržují vyvozování doporučujících závěrů pro jiné kohorty pacientů, a to i přes příznivý průběh studie (Russo, *et al* 2013).

Vzorky k měření MRN jsou v rámci jednotlivých léčebných protokolů odebírány v konkrétní dny od počátku léčby. Analyzován je i diagnostický vzorek, neboť všechna následná měření MRN jsou vztahována právě k tomuto vzorku.

Metodicky je možné měřit množství leukemických buněk několika základními způsoby, a to pomocí

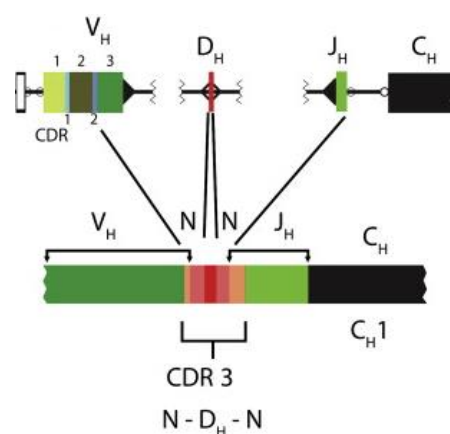
- a) *Fluorescence in situ hybridization* (v klinické praxi je využívána, slouží ke stanovení cytogenetické odpovědi na léčbu a přispívá tak ke stratifikaci pacientů; této metodě jsem se ovšem ve své práci nevěnovala)
- b) průtokové cytometrie,
- c) detekce klonálních přestaveb genů pro imunoglobuliny či T-buněčné receptory (Ig/TCR),
- d) měření exprese fúzního genu,
- e) nebo kvantifikace buněk s využitím konkrétní přechodové oblasti BCR/ABL, která je u každého pacienta specifická.

5.4.1 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie nabízí možnost detekce MRN na základě kombinace povrchových či intracelulárních markerů, které jsou specifické pro leukemické buňky. Citlivost této metody je ve srovnání s níže uvedenými nižší a dosahuje detekce jedné leukemické buňky mezi přibližně 10 000 zdravými. Výhodou této metody je široká aplikovatelnost, rychlost a možnost získání aditivních informací o leukemických buňkách. V průběhu onemocnění může však dojít k imunofenotypovému posunu maligních buněk, což ztěžuje detekci MRN. Nicméně výsledky měření MRN touto metodou a sledováním přestaveb genů pro Ig/TCR u ALL jsou vysoce konkordantní (Kerst, *et al* 2005, Neale, *et al* 2004).

5.4.2 Klonální přestavby Ig/TCR

U každého jedince jsou z biologické podstaty V(D)J přestaveb lymfocytů sekvence genů kódujících imunoglobuliny a T-buněčné receptory unikátní (viz Obrázek 3). Po vystřížení genových segmentů dochází k náhodné inkorporaci nukleotidů do oblasti zlomu, čímž je zvyšována variabilita vazebného místa pro antigen. S jistou nadsázkou lze říci, že v žádných dvou lymfoidních buňkách neproběhne tato přestavba zcela stejně. Pokud však dá lymfoidní progenitor s již dokončenou přestavbou vznik leukemickému klonu, všechny jeho „dceřinné“ buňky již velmi pravděpodobně



Obrázek 3 VDJ přestavba Ig těžkého řetězce zobrazující inzerci nukleotidů (N) mezi jednotlivé segmenty; CDR - Complementarity determining region; převzato a upraveno z Schroeder and Cavacini 2010

ponesou tuto konkrétní a jedinečnou představbu. Této unikátnosti je využíváno při měření hladiny MRN a je tímto zajištěna metodická specifická pro každého pacienta.

Tento způsob detekce MRN je široce využíván a standardizován, k primární detekci zlomů se využívá konsensus set primerů. Následně je nalezena abnormálně zastoupená klonální představba pro specifický receptor a každému pacientovi navržen specifický primer (ASO; *allele-specific oligomer*) pro kvantifikaci buněk (viz Měření MRN na základě přestaveb pro Ig/TCR – kapitola 7.9), která se provádí metodou kvantitativního PCR v reálném čase (RQ-PCR; *Real time quantitative polymerase chain reaction*).

Touto metodou lze detekovat jednu leukemickou buňku mezi až 100 000 zdravými. V celkovém měřítku se podaří najít vhodný cíl pro detekci přibližně u 98 % pacientů, doporučené dva cíle lze nalézt přibližně u 93 % pacientů (Flohr, *et al* 2008).

Nevýhodou takového způsobu detekce je jednak jeho pracnost a také fakt, že během progresu leukemického onemocnění a léčby může dojít ke změně nebo ztrátě přestavby, která byla detekována v diagnostickém vzorku. Takto je možné získat falešně negativní výsledky hladiny MRN a proto je doporučováno najít dva vhodné cíle (AEIOP-BFM) a detekovat MRN nezávisle pomocí obou (pravděpodobnost vymizení obou cílů/klonů je mnohem nižší). Tímto způsobem ovšem nelze vyšetřovat pacienty s CML (myeloidní buňky své imunoreceptorové geny zpravidla nepřestavují).

5.4.3 Hladina exprese BCR/ABL mRNA

Philadelphský chromozom je specifickým markerem leukemických buněk, čímž nabízí možnost jejich odlišení od buněk zdravých, Ph negativních, a to na dvou úrovních – na úrovni exprese nově vzniklého fúzního genu a na genomické úrovni, s využitím detekce intronové oblasti zlomu. Široce využívanou metodou je první z uvedených. Jak již bylo výše zmíněno, exonových spojení se běžně vyskytují jen tři základní varianty (jedna pro minor BCR/ABL a dvě pro Major BCR/ABL) a jiné typy zlomů jsou nalézány jen velmi vzácně. Tato metoda je tedy rychlá – z patientského vzorku je izolována RNA, ta je přepsána do cDNA (*complementary DNA*) s využitím reverzní transkripce. Ke kvantifikaci pomocí RQ-PCR je pak použito vždy stejných primerů a sond. Negativem tohoto přístupu je však „patientská nespecifita“, neboť může dojít ke kontaminaci mezi vzorky jednotlivých pacientů a vzniku falešně pozitivních výsledků.

Měření MRN touto metodou má i další nevýhody. Mezi prvními z nich je třeba zmínit nižší stabilitu RNA ve srovnání s DNA. Vzorek je po odebrání dopravován do laboratorního centra, které kvantifikaci provádí. Během této doby mohou nastat podmínky nevhodné pro

udržení kvalitní RNA. Dalším problémem je odlišná exprese BCR/ABL mRNA s ohledem na vývojové stadium postižené buňky (Bedi, *et al* 1993, Waller, *et al* 1999). Bylo ukázáno, že časné prekursory tento fúzní gen příliš neexprimují, a tak i přes citlivost této metody (detekce 10 i méně kopií cDNA ve vyšetřovaném vzorku), nemusejí být molekuly BCR/ABL transkriptu detekovány. Avšak právě časné hematopoetické prekursory by mohly být zodpovědné za udržení leukémie. V souvislosti s postižením lymfoidních i myeloidních buněk se hovoří o leukemických kmenových buňkách (LSC; *Leukemic stem cells*), tedy časných prekuzorech, které dají vznik oběma vývojovým liniím a při tom nepřepisují (nebo jen ve velmi malém množství) gen kódující kinázu BCR/ABL (Castor, *et al* 2005). V určitých situacích tedy hrozí i možnost falešně negativních výsledků, a to i přes setrvávající LSC v kostní dřeni pacienta.

Při tomto způsobu měření hladiny MRN je nutno standardizovat množství vyšetřované cDNA. Za tímto účelem se exprese genu pro BCR/ABL vztahuje k expresi vybraného „housekeeping“ genu, tedy genu, který je v ideálním případě exprimován ve všech buňkách ve stejné míře, a to jak v leukemických, tak ve zdravých, nezávisle na stupni diferenciaci. K tomuto účelu bylo vytipováno několik genů – ABL (Abelsonův gen), β 2M (beta 2 mikroglobulin) a GUS (glukuronidáza) (Beillard, *et al* 2003). V současné době však neexistuje konsensus gen, který by byl považován za standard a který by využívaly všechny laboratoře, přestože snahy o standardizaci detekce existují a zvláště u CML jsou již na vysoké úrovni. Lze tedy diskutovat porovnatelnost výsledků mezi jednotlivými centry, která používají různé „housekeeping“ geny.

Z výše popsaného je zřejmé, že by bylo vhodné nalézt metodu jinou – snadno reprodukovatelnou, specifickou a detekující všechny leukemické buňky bez ohledu na stadium jejich diferenciaci či liniové příslušnosti.

5.4.4 Detekce zlomů BCR/ABL na genomické úrovni

Detekce zlomu ve fúzním genu BCR/ABL na genomické úrovni takovou metodou je. Tento přístup zajišťuje patientskou specificitu, neboť zlomy v obou zúčastněných genech vznikají v rozsáhlých intronových oblastech, a pravděpodobnost vzniku stejného zlomu u dvou pacientů je tedy reálně nulová.

Tato metoda postrádá nevýhody práce s mRNA, zlom a přítomnost Ph chromozomu jsou stabilní ve všech leukemických buňkách bez ohledu na vývojové stadium či příslušnou

vývojovou linii. Navíc je tato metoda specifitější než metoda pro detekci klonálních přestaveb pro Ig/TCR, neboť její pomocí je detekován vždy skutečně celý leukemický klon.

Hledání zlomů BCR/ABL na genomické úrovni je však vzhledem k délce zúčastněných intronů technicky obtížné a, přestože se jím v současné době zabývá několik laboratoří, tato metoda není standardizovaná a v klinické praxi se nevyužívá.

5.5 Clusterování zlomů

Doposud bylo provedeno několik analýz týkajících se clusterování zlomů v rámci genu BCR i ABL. Místa zlomů byla navíc porovnávána se sekvencemi, které jsou rozpoznávány např. topoizomerázou II, Alu enzymem a RAG1/2 rekombinázami (Score, *et al* 2010).

Otázkou bylo i to, zda dochází k odlišnému clusterování v závislosti na věku (dospělí vs děti) a onemocnění (pouze v genu ABL; CML vs ALL). Žádná z prací neukázala clusterování v rámci genu ABL (Burmeister, *et al* 2011, Krumbholz, *et al* 2012, Score, *et al* 2010, Zhang, *et al* 1995). Ani v rámci genu pro BCR (a to jak v případě zlomů v *minor*, tak v *Major* oblasti) nebylo patrné žádné významné clusterování, s výjimkou dětských případů s CML (Krumbholz, *et al* 2012), kde autor uvádí bimodální rozložení vzniklých zlomů.

Analýza jednotlivých zlomů ukázala na častý výskyt repetitivních sekvencí a mikrohomologií, které naznačují vznik zlomů pomocí nehomologního spojování konců. V některých studiích byla zaznamenána blízkost Alu sekvencí u místa zlomu (Jeffs, *et al* 1998). Avšak poznatky v tomto směru jsou poměrně diskrepantní (Score, *et al* 2010). Alu sekvence patří mezi SINE elementy (*short interspersed nuclear elements*). Dalšími třemi kategoriemi *rozptýlených elementů* jsou LINE (*long interspersed nuclear elements*), LTR (*long terminal repeats*) a DNA transpozony. Všechny tyto sekvence byly nalezeny jako součást genů BCR i ABL a jsou zahrnovány do analýz vedoucích k pochopení vzniku translokací.

Score a jeho kolegové pozorovali poměrně častý výskyt kryptických RSS (*Recombination signal sequence*) u p190⁺ pacientů. Na základě svých pozorování poukázali na možnou účast RAG rekombináz při vzniku zlomů u ALL pacientů, zatímco u CML pacientů se na základě přítomných mikrohomologií přiklání k NHEJ. Možnost nehomologního spojování konců je navrhována i jinými autory (Burmeister, *et al* 2011, Krumbholz, *et al* 2012).

6 Cíle práce

Cílem mé práce bylo optimalizovat systém pro detekci zlomů BCR/ABL na genomické úrovni a využít nalezených zlomů k detekci minimální reziduální nemoci. Takto naměřené hodnoty MRN následně porovnat s výsledky standardního měření MRN získané jak detekcí klonálních přestaveb pro Ig/TCR, tak měřením exprese fúzního genu BCR/ABL. Předpokládali jsme, že případné diskrepance mezi jednotlivými metodami nám podají informaci o postižených buňkách – jejich vývojovému stádiu a lymfodní/myeloidní příslušnosti.

Dalším záměrem bylo porovnat místa a oblasti zlomů s výsledky již dříve publikovaných prací.

7 Metody a materiál

7.1 Použitý biologický materiál

Ve své práci jsem pracovala s nukleovými kyselinami ze zamražených pelet mononukleárních buněk od pacientů, od kterých byl získán informovaný souhlas týkající se využití těchto buněk pro vědecké účely. Jako negativní kontrola sloužila DNA izolovaná z buněk periferní krve zdravých dárců, tzv. buffy coatů. Buffy coaty vznikají smícháním mononukleárních buněk minimálně od pěti zdravých dárců. Mononukleární buňky byly izolovány z periferní krve či suspenze kostní dřeně centrifugací na hustotním gradientu (Ficoll-Paque Research Grade (PharmaTech)).

Dalším materiálem byly buňky z buněčných linií K562, JURL a SupB15.

Ze všech získaných buněk byla DNA získána jednou z dále popsaných metod.

7.2 Izolace DNA

V závislosti na množství zamražených buněk v jedné zkumavce a předchozí izolaci RNA byla DNA izolována jednou z následujících metod.

- Izolace DNA vysolováním
- Izolace z fenolové fáze
- Izolace s využitím DNA QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Německo)
 - 10 – 2 miliony buněk
- Izolace s využitím DNA QIAamp® DNA Blood Micro Kit (Qiagen, Německo)
 - méně než 1 milion buněk
- Izolace BioRobotem (EZ1® DNA Tissue Kit; Qiagen, Německo)

Poslední tři zmíněné metody byly používány standardně, podle návodu výrobce.

7.2.1 Dělení aliquotu na izolaci DNA u pacienta s omezeným množstvím materiálu

Vzhledem k nedostatku materiálu u diagnostického vzorku jednoho z pacientů bylo nutné zamraženou peletu (-80°C) s 10 miliony buněk rozdělit. Část buněk byla použita na izolaci DNA vysolováním, část buněk byla zamrazena na -20°C a použita na diagnostické účely (izolaci RNA).

Použité reagensie

Roztok ITG:

4M Guanidinium isothiocyanát

25mM citrát sodný, pH 7

0,5% N-Laurylsarcosin sodná sůl

2-Merkaptoethanol

K vytemperované peletě buněk bylo přidáno 1ml ITG s merkaptoethanolem (1 ml ITG + 0,72 µl merkaptoerthanolu). Směs byla důkladně zvortexována a po 500 µl rozpipetována do malých zkumavek (Eppendorf). Pro izolaci DNA byla použita metoda vysolování dle níže uvedeného postupu.

7.2.2 Izolace DNA vysolováním

Millerovu metodu izolace DNA vysolováním (Miller 1988) jsme zvolili pro několik úvodních vzorků, neboť naším záměrem bylo získat dlouhé úseky DNA vhodné pro následující Long Distance PCR (LD PCR). Tato metoda je k DNA šetrná a nedochází k její fragmentaci v takové míře, jako je tomu u komerčně používaných kitů. Během práce s DNA získanou vysolováním se však ukázalo, že takto získaná DNA inhibuje průběh kvantitativního PCR. DNA musela být 100x naředěna, aby průběh reakce nenarušovala. (Vzhledem k negativním výsledkům i na úrovni LD PCR jsme později přistoupili k izolaci DNA pomocí QIAamp® DNA Blood Mini Kitu (Qiagen, Německo)).

Použité reagensie

Roztok lyzující jaderné membrány

Proteináza K

10% roztok dodecil sulfátu sodného (SDS; *Sodium dodecil sulfate*)

6M NaCl

96% ethanol

70% ethanol

Voda pro injekce

Použité přístroje

Vodní lázeň Techne Tempette® TE-8A (Velká Británie)

Centrifuga UNIVERSAL 320R Hettich Zentrifugen,

vícenásobný nosič poloměr rotoru 150 mm (Švýcarsko)

Pracovní postup

Peleta buněk zamražená v malých zkumavkách (Eppendorf) v -80°C se ponechala vytemperovat na pokojovou teplotu. Do zkumavek byl přidán 1 ml roztoku lyzujícího jaderné membrány, směs byla protažena pipetou a přenesena do 14ml zkumavek. Následně byly přidány 2 ml roztoku lyzujícího jaderné membrány.

Ke vzorku bylo napipetováno 0,6 ml Proteinázy K a 0,2 ml SDS, směs byla promíchána otáčením zkumavky.

Vzorek byl ponechán k inkubaci po dobu minimálně 18 hodin ve vodní lázni při teplotě 37°C.

Po inkubaci byl přidán 1 ml NaCl a zkumavka byla ručně protřepána. Vzorek byl následně centrifugován po dobu 20 minut při 5 000 rpm a teplotě 23°C. V případě, že v supernatantu po centrifugaci byly přítomny závoje, byl supernatant slit do čistých zkumavek a došlo k opakování centrifugačního kroku, dokud supernatant nebyl čirý.

Supernatant byl přelit do čistých zkumavek, do nichž bylo přidáno 8 ml vymraženého 96% ethanolu. Směs byla promíchána otáčením zkumavky.

Po promíchání byla okem patrná precipitovaná DNA, kterou bylo možno zachytit na plastové háčky.

Plastový háček s přichycenou DNA byl přenesen do malé zkumavky (Eppendorf) se 70% ethanolem, DNA zde byla opláchnuta a následně ponechána na vzduchu oschnout. Háček s oschlou DNA byl ponořen do malé zkumavky (Eppendorf) s vodou pro injekce. DNA se ve zkumavce takto rozpouštěla po dobu jednoho týdne.

V případě, že nedošlo k viditelné precipitaci DNA po přidání 96% ethanolu, vzorek byl 10 min centrifugován při 5 000 rpm a teplotě 23°C. Supernatant byl odpipetován a k peletě přidána voda pro injekce. Peleta byla týden takto ponechána, aby došlo k jejímu rozpuštění.

7.2.3 Izolace DNA z fenolových fází

U některých pacientů bylo nutno vzhledem k nedostatku buněčných pelet u jednotlivých vzorků izolovat DNA i RNA ze stejné buněčné pelety, DNA tedy byla izolována z fenolových fází. Takovouto DNA lze následně izolovat pomocí etanolové precipitace

a promytím citrátem sodným, který zbaví roztok proteinů a sacharidů. DNA je následně eluována do vody.

Použité chemikálie

Etanol – 100% a 70%

0,1M citrát sodný v 10% etanolu

Voda pro injekce

Použité přístroje

Vortex Yellow line TTS 2 (IKA®, Německo)

Centrifuga UNIVERSAL 320R Hettich Zentrifugen,

vícenásobný nosič 24 x 1,5 ml (Švýcarsko)

Cleaver Scientific Ltd Minicentrifuga c1301P – stolní centrifuga (Korea)

Thermomixer Compact (Eppendorf)

Pracovní postup

Rozmrazené minizkumavky (Eppendorf) s fenolovými fázemi byly centrifugovány 5 min při 12 700 rpm a 4°C.

Po centrifugaci byl pipetou odstraněn zbytek vodné fáze (obsahující RNA) a ke vzorku bylo přidáno 330 µl 100% etanolu. Po dobu 1 minuty byl vzorek důkladně vortexován. Vzorek následně stál při pokojové teplotě minimálně 3 minuty a poté byl stočen na centrifuze 15 minut při 14 000 rpm a 4°C.

Pipetou byl opatrně odsán supernatant a k peletě přidán 1 ml 0,1M citrátu sodného v 10% etanolu. Takto získané roztoky se ponechaly stát 30 minut při pokojové teplotě. Během této doby byly vzorky 4x vortexovány, vždy po dobu 1 minuty. Po uplynutí 30 minut byly vzorky stočeny 15 minut při 14 000 rpm a 4°C, byl odsát supernatant. Celý tento krok byl opakován ještě jednou.

V dalším kroku byl odsát supernatant a k peletě bylo přidáno 1,5 ml 70% etanolu. Vzorky se ponechaly stát 20 minut při pokojové teplotě. Následně byly vzorky stočeny 15 minut při 14 000 rpm a 4°C.

Pipetou byl odstraněn všechn supernatant a vzorky se ponechaly vysušit na vzduchu, aby došlo k odpaření veškerého etanolu. K vysušenému vzorku bylo přidáno 100 µl vody pro injekce. Minizkumavky byly následně vloženy do předem vyhřátého bloku na 65°C na 30 minut. V průběhu inkubace byly vzorky 2x promíchány. Po uplynutí 30 minut byly

vzorky centrifugovány 15 minut při 14 000 rpm a 4°C. Takto získaný supernatant obsahoval DNA.

7.3 Stanovení koncentrace DNA

Koncentrace DNA, která byla získána jednou z výše uvedených metod, byla stanovena pomocí spektrofotometru či měřením koncentrace kontrolního genu.

7.3.1 Stanovení koncentrace DNA na spektrofotometru

Koncentrace vzorku je měřena na základě různě vysoké míry absorpance v závislosti na množství DNA ve vzorku.

Použité přístroje

NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometr (USA)

Pracovní postup

Při měření koncentrace na NanoDropu® byla jako blank použita voda pro injekce. Všechny vzorky, včetně blanku, byly nanášeny v objemu 1 µl. Pro kontrolu kvality takto změřené koncentrace sloužily poměry absorbancí 260/280 nm (optimálně v rozsahu 1,8 – 2,0) a 260/230 nm (optimálně v rozsahu 1,8 – 2,0). Takto stanovená koncentrace byla pouze orientační a nesloužila k ředění DNA na kvantitativní PCR v reálném čase (RQ-PCR; viz dále).

7.3.2 Stanovení koncentrace DNA pomocí kontrolního genu pro albumin

Tato metoda využívá RQ-PCR, jehož výsledkem je kalibrační křivka, pomocí níž je stanovena neznámá koncentrace vzorků. Základem je známá koncentrace standardu (Human Genomic DNA, Roche), z něhož je vytvořena ředící řada ($10^0 - 10^{-3}$). Ct (cycle threshold; pořadí cyklu, v němž fluorescence překročí signál pozadí; je nepřímo úměrný množství cílové DNA ve vzorku) těchto ředění následně určí parametry kalibrační křivky. Takto měřeným kontrolním genem je gen pro albumin.

Použité přístroje

Vortex IKA® MS 3 Basic (IKA, Německo)

Cleaver Scientific Ltd Minicentrifuga c1301P – stolní centrifuga (Korea)

Složení 1 reakce:

AmpliTaQ Gold® 360 Master Mix (Applied Biosystems, USA)	12,5 µl
voda pro injekce	5,25 µl
primery (10 mM)	1,25 µl
Sonda (4 nM)	1,25 µl
BSA (Bovinní serum albumin)	1,00 µl
DNA	2,50 µl

Teplotní profil

1 x	95 °C	10 min
50 x	95 °C	15 s
	60 °C	60 s

Pracovní postup

Pro každé měření byla vytvořena nová ředící řada ze standardu o známé koncentraci (200 ng/µl ~ 10⁰) v rozsahu 10⁻¹ – 10⁻³ a to vždy 5 µl DNA do 45 µl vody pro injekce. Před každým dalším ředěním byl každý vzorek důkladně vortexován a ponechán 10 min při 4°C, než se postoupilo k dalšímu ředění.

Vzorky pacientů a vzorky standardu byly měřeny v duplikátech, negativní kontrolou byla reakce s vodou pro injekce.

Vyhodnocení

Pro porovnatelnost jednotlivých měření koncentrace DNA byla hodnota Ct ředění 10⁰ standardu posunuta vždy do 21,5 cyklu. Hodnoty Ct v rámci duplikátů nesměly překročit rozdíl 1,5 cyklu, a to jak v rámci ředění standardu (měření by muselo proběhnout znovu, aby byla utvořena kalibrační křivka), tak i v rámci měření patientské DNA (vzorek by nebyl kvantifikován). Hodnota korelačního koeficientu kalibrační křivky musela nabývat hodnot $\geq 0,98$ a sklon (slope) se musel pohybovat v rozmezí od -3,1 do -3,9, včetně. Průměr koncentrací duplikátů stanovený na základě kalibrační křivky byl následně použit k výpočtu koncentrace patientské DNA (kde hodnoty 10⁻¹ odpovídaly 20 ng/µl, 10⁻² ~ 2 ng/µl, atd.)

K detekci intronových zlomů mezi geny BCR a ABL na DNA úrovni jsme použili Long distance PCR a následnou sekvenaci.

7.4 Long distance polymerázová řetězová reakce (LD-PCR)

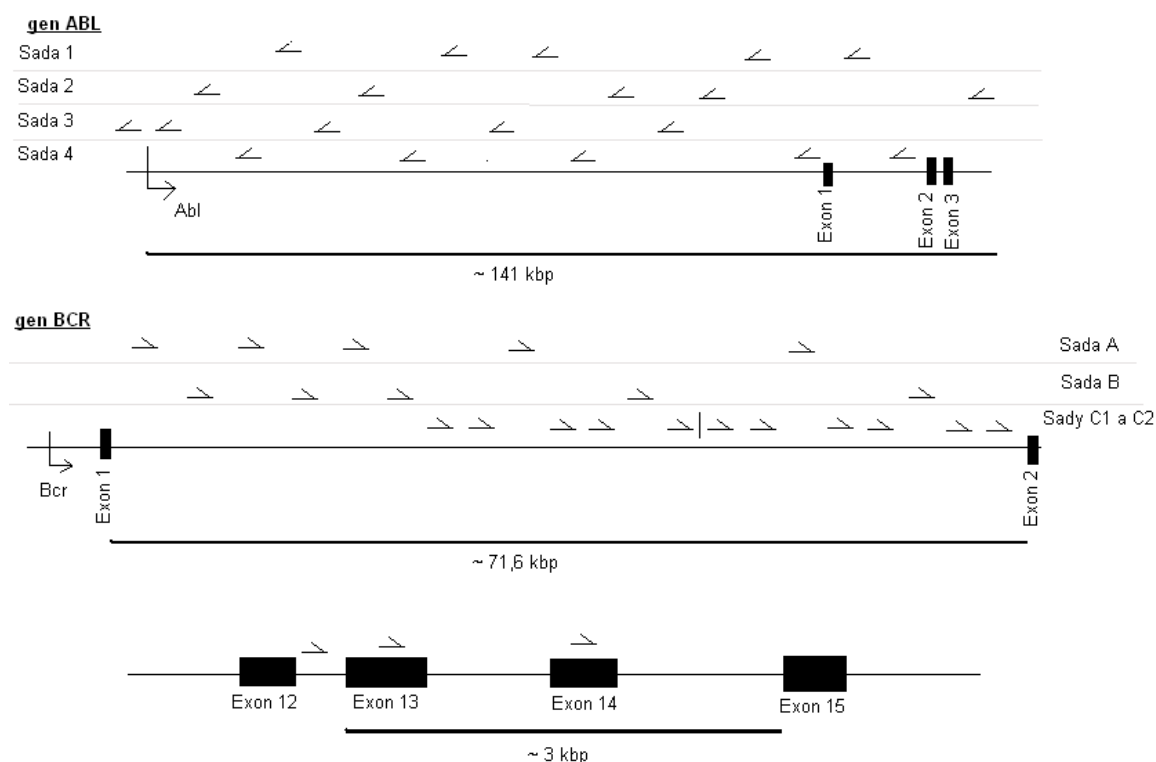
7.4.1 Primery na LD-PCR

Sekvence jednotlivých primerů na LD-PCR byly převzaty z literatury (Krumbholz, *et al* 2012, Ross, *et al* 2010, Score, *et al* 2010).

ABL primery, kterých bylo celkem 20, byly rozděleny do čtyř sad (1-4) po pěti primerech. Tyto sady byly použity u pacientů s minor i Major variantou, neboť na ABL straně vznikají zlomy ve stejné oblasti.

BCR primery pro identifikaci zlomů v minor oblasti (celkem 21) byly taktéž rozděleny do čtyř sad (A, B, C1, C2) – tři z nich byly po pěti primerech, ve čtvrté bylo primerů 6 (C2). Pro hledání zlomů v Major oblasti byly použity dva primery (BCR ex13, BCR ex14), v případě negativity prvního kola LD-PCR i primer BCR ex12.

Primery v jednotlivých sadách 1-4 (ABL) a A, B (BCR) byly uspořádány tak, že jejich vzájemná vzdálenost neumožňovala amplifikaci zlomu pomocí dvou různých primerů v jedné reakci. Sekvence jednotlivých primerů včetně jejich vzájemné vzdálenosti a pozice v příslušných genech schematicky znázorňuje Obrázek 4 a shrnuje Tabulka 1.



Obrázek 4 Pozice primerů pro LD-PCR

ABL primery			minor BCR primery			Major BCR primery	
	vzdálenost od následujícího primeru (kb)	vzdálenost od následujícího primeru v sadě (kb)		vzdálenost od následujícího primeru (kb)	vzdálenost od následujícího primeru v sadě (kb)		vzdálenost od následujícího primeru (kb)
ABL EXOSC2	10,8	10,8	BCR 1A	8,9	13,4	BCR ex12	0,3
ABL 006	7,5	34,1	BCR 1B	4,5	11,7	BCR ex13	0,9
ABL 014	9,4	37,4	BCR 2A	7,2	16	BCR ex14	
ABL 023	9,8	32,9	BCR 2B	8,8	14,2		
ABL 032	7,4	30,0	BCR 3A	5,4	12,1		
ABL 040	10,8	30,3	BCR 3B	1,8	13,5		
ABL 051	4,9	37,6	BCR 1C	2,5	2,5		
ABL 056	6,9	27,2	BCR 2C	2,4	3,6		
ABL 063	7,7	14,6	BCR 4A	1,2	15,4		
ABL 070	6,9	30,3	BCR 3C	2,4	2,4		
ABL 077	5,7	38,1	BCR 4C	3,2	4,8		
ABL 083	5,5	40,4	BCR 4B	1,6	16,2		
ABL 089	8,2	18,6	BCR 5C	2,5	2,5		
ABL 097	10,4	26,3	BCR 6C	1,8	1,8		
ABL 107	8,3	38,7	BCR 7C	2,7	4,9		
ABL 115	8,0	19,2	BCR 5A	2,2			
ABL 123	11,2	15,2	BCR 8C	3,2	3,2		
ABL 135	4,0		BCR 9C	2,2	4,9		
ABL 139	7,2		BCR 5B	2,7			
ABL 146			BCR 10C	2	2		
			BCR 11C				

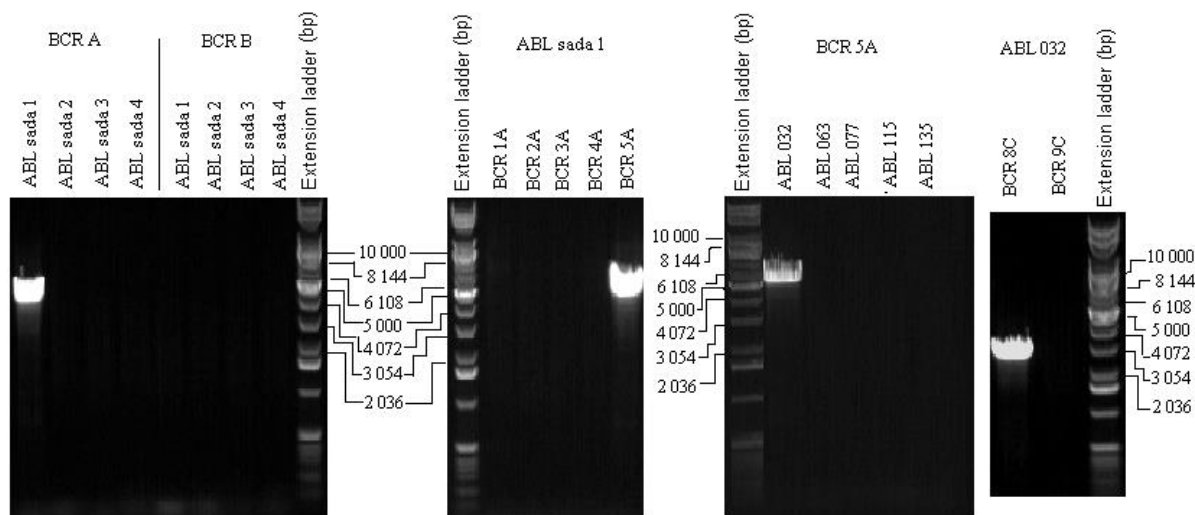
Tabulka 1 Rozložení primerů na LD-PCR

7.4.2 Multiplex PCR

První kolo LD-PCR u pacientů s Major zlomy mělo "simplex" uspořádání. V jedné reakci byl vždy použit 1 BCR primer a 5 ABL primerů (jedna sada). Po nalezení positivity v jedné z reakcí (vizualizace na agarózové elektroforéze, viz dále) jsme zvolili klasické uspořádání 1 BCR a 1 ABL primer na reakci.

Vzhledem k tomu, že minor oblast zlomů na chromozomu 22 je rozsáhlejší, uspořádání prvního kola LD-PCR u takto postižených pacientů bylo komplikovanější. Na ABL straně zůstalo uspořádání stejné (tedy 5 ABL primerů na reakci), na BCR straně došlo ke zvýšení počtu primerů taktéž na 5 (prvního kola se účastnily sady A a B, obě obsahující po pěti primerech). Po nalezení positivity u jedné z reakcí jsme nejdříve rozpipetovali primery na BCR straně a ve třetím kole i na ABL straně. V případě, že mezi pozitivním primerem na BCR straně a prvním následujícím negativním primerem na BCR straně (oba jsou součástí sady A nebo B), ležely některé z primerů ze sad C1 a C2, pokusili jsme se s využitím těchto primerů ještě přiblížit ke zlomu (tj. čtvrté kolo LD-PCR, viz Obrázek 5).

Pokud bylo první kolo (sady A a B) LD-PCR negativní, využili jsme pro "double multiplex" sady C1 a C2 a po nalezení pozitivitu jsme postupovali stejně, jak bylo výše popsáno.



Obrázek 5 Posloupnost od multiplex PCR k simplex PCR a přibližování ke zlomu

Na LD-PCR byly využity dva polymerázové systémy:

7.4.2.1 PCR Extender System (5 Prime, Německo)

Složení reakce:

Mastermix 1

		Výsledná koncentrace
Primery (20 µM)	á 1 µl	400 nM
DNA	y µl	250 ng
Voda pro injekce	Doplnit do 10 µl	

Pozn.: V případě, že objem Mastermixu 1 překročil hranici 10 µl, byl celkový objem 50 µl korigován množstvím vody v Mastermixu 2.

Mastermix 2

Voda pro injekce	32,1 µl
10 x Tuning pufr s Mg ²⁺	5 µl
dNTP mix	2,5 µl
PCR Extender Polymerase Mix	0,4 µl
Celkem	40 µl

Teplotní profil

1x	93°C	3 min
20x	93°C	15 s
	63°C	30 s
	68°C	10 min
30x	93°C	15 s
	62°C	30 s
	68°C	10 min + 20 s á cyklus
nekonečno	15°C	

7.4.2.2 AccuPrime™ Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, USA)

Vzhledem k neuspokojivým výsledkům při používání Extender polymerázy v našem systému jsme postupně přistoupili k používání polymerázy AccuPrime™ Taq.

Složení reakce

Mastermix 1

		Výsledná koncentrace
Primery (10 µM)	á 0,5 µl	200 nM
DNA	y µl	125 ng
Voda pro injekce	Doplnit do 10 µl	

Mastermix 2

Voda pro injekce	12,4 µl
10 x AccuPrime™ PCR pufr II	2,5 µl
AccuPrime™ Taq High Fidelity	0,1 µl
Celkem	15 µl

Teplotní profil

1x	94°C	1 min
10x	94°C	15 s
	64°C	30 s
	68°C	10 min
20x	94°C	15 s
	62°C	30 s
	68°C	10 min + 20 s á cyklus
nekonečno	15°C	

7.4.2.3 Vizualizace

Produkty z LD-PCR byly vizualizovány na 0,4 % agarózové elektroforéze.

Použité reagensie:

0,2 % NuSieve® GTG® Agarose (Lonza, USA)

0,2 % Ultrapure Agarose (Invitrogen, USA)

TAE pufr 50x ředěný:

Tris base (tris(hydroxymethyl)aminomethan (Sigma-Aldrich) 121 g

Kyselina octová 28,5 ml

Na₂EDTA pH8=0,5M 50 ml

Doplnit vodou pro injekce do 500 ml

GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium) 2 µl/50 ml TAE pufru

6x DNA Loading Dye (Thermo Scientific)

Použitý žebříček:

1 Kb DNA Extension Ladder (Invitrogen, USA)

Vzorek byl před nanesením na gel smíchán s GelRed Nucleic Acid Stain. Na elektrody bylo vloženo napětí 100 V po dobu 1 hodiny. Následnou vizualizaci jsme prováděli na přístroji UV Transiluminator 2000 (Biorad, Italy).

7.4.3 Kontrolní primery

Kontrolní primery byly využity pro důkaz úspěšné izolace dostatečně dlouhé DNA či k ověření funkčnosti LD-PCR systému (v případě izolace DNA vysolováním). Kontrolní primery amplifikují sekvenci ležící na chromozomu **7** a pokrývají sekvenci genu IKZF1. Jejich produkty ležely v rozmezí 2 – 12 kbp (viz Tabulka 2)

Název primeru	Sekvence	Délka produktu (kbp)
AR4 (reverse)	CTTCAGCCCATCACTGCTGCACTG	-
AR4 fow2b	GGTCACATTTCAAGTGCTCAGGAGTCAC	2
AR4 fow3	CATGCCAGGAAGCTGCCCTACCAAG	5
AR4 fow4b	GTTTCAGGCAGAAGACCAGCACGGTAG	10
AR4 fow5	GCATCACAGAATGGCCTTGAGGGTTAG	12

Tabulka 2 Kontrolní primery na LD-PCR

7.5 Přečištění vzorku po LD-PCR, sekvenace

Vzorky určené k sekvenaci byly přečištěny kitem MinElute PCR Purification kit (Qiagen, Německo) podle návodu výrobce. Takto přečištěné vzorky jsme nechali osekvenovat na Ústavu lékařské biologie a genetiky ve Fakultní nemocnici v Motole na přístroji ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). Nepřečištěné vzorky jsme nechali sekvenovat v Laboratoři molekulární genetiky Pediatrické kliniky ve Fakultní nemocnici v Motole na přístroji 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA).

7.6 Analýza výsledků sekvenace a návrh specifických primerů

Všechny výsledky sekvenací byly porovnány s internetovou databází NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). V případě, že se nepodařilo osekvenovat zlom, přistoupili jsme k metodě *walking primers*, tj. snažili jsme se přiblížit ke zlomu navržením dalších primerů. První primer ležel v osekvenované oblasti, další následující 500 – 1 000 bp za předchozím (s ohledem na vzdálenost dalšího primeru ze sad A, B, C1, C2 popřípadě 1-4,

se kterým se zlom již nepodařilo amplifikovat). Tyto nově navržené primery byly puštěny na LD-PCR s AccuPrimeTM Taq polymerázou (viz výše).

V případě, že se zlom podařilo osekvenovat, byly navržené primery specifické pro každého pacienta v závislosti na poloze zlomu tak, že forward primery ležely v BCR oblasti a reverse primery v ABL oblasti. Primery byly navrženy tak, aby se výsledný produkt pohyboval kolem optimální délky 150 bp. U každého pacienta byly navrženy vždy dva forward a dva reverse primery (pouze u jednoho z pacientů byl navržen pouze jeden reverse primer, s ohledem na sekvenci následující za zlomem). U pacientů, kde byla optimalizace PCR obtížnější (docházelo k amplifikaci nespecifických úseků (viz dále)), jsme přistoupili k navržení hydrolyzačních sond. Sekvence sond byla navržena tak, aby jejich teplota tání byla přibližně o 10°C vyšší než tomu bylo u příslušných forward a reverse primerů.

Primery byly v rozsahu 19 - 29 bp, byla u nich provedena kontrola tvorby vlásenek a dimerů, jejich teplota tání byla podobná (s maximálním rozdílem 1°C) a pohybovala se kolem 56°C. Vazba na specifickou sekvenci byla ověřena v databázi NCBI BLAST (viz výše).

Všechny primery byly navrhovány pomocí programu VECTOR NTI 8 Suite Software (INFORMAX, Bethesda, MD, USA).

K amplifikaci specifických úseků DNA byla využita metoda kvantitativního PCR v reálném čase s využitím interkalačního činidla SYBR Green, popřípadě hydrolyzační sondy.

7.7 Kvantitativní PCR v reálném čase (RQ-PCR)

Metoda RQ-PCR je založena na vytvoření kalibrační křivky (viz měření koncentrace DNA pomocí kontrolního genu pro albumin) vzniklé měřením vzorků o známé koncentraci. V případě měření MRN se průběh kalibrační křivky stanovuje na základě ředící řady diagnostického (popřípadě relapsového) vzorku konkrétního pacienta. Koncentrace diagnostické vzorku je změřena pomocí RQ-PCR pro albumin a naředěna na koncentraci 20 ng/μl ($\sim 10^{-1}$, tedy 10%). Tato koncentrace je dále (semi-)logaritmicky ředěna; jednotlivými ředěními tedy jsou 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 5×10^{-4} , 10^{-4} a 10^{-5} , všechna ředění se provádějí do DNA z buffy coatů o stejné koncentraci. Vzorky ředící řady jsou měřeny

v duplikátech, pouze ředění 10^{-4} se provádí v tetraplikátu. Jako negativní kontrola slouží DNA z buffy coatů (měřena v hexaplikátu) a voda pro injekce (pouze jeden vzorek). Každý patientský vzorek určený k vyšetření hladiny MRN je měřen v tripplikátu.

7.7.1 Schéma RQ-PCR

Pro ověření specificity navržených primerů bylo nejdříve provedeno RQ-PCR se všemi možnými kombinacemi primerů (2 forward a 2 reverse, tedy čtyři kombinace). Toto bylo provedeno na diagnostickém popřípadě relapsovém vzorku pacienta, jako negativní kontrola sloužila DNA z buffy coatů a voda. K dalšímu měření byla vybrána dvojice primerů s nejlepším výsledkem (negativní buffy coaty a voda, optimální délka produktu – ověřeno pomocí 2% agarózové elektroforézy). S touto dvojicí primerů byla následně kvantifikována ředící řada diagnostického/relapsového vzorku, popřípadě byly prováděny optimalizace systému, aby došlo k vytvoření optimální kalibrační křivky (viz kapitola 7.8). Následně byla změřena MRN.

Použité přístroje

Vortex IKA® MS3 Basic (IKA, Německo)

Cleaver Scientific Ltd Minicentrifuga c1301P – stolní centrifuga (Korea)

Tube-strip PicoFuge™ STRATAGENE® (Lab System Praha, CZ)

7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA)

7.7.2 SYBR Green RQ-PCR

SYBR Green je interkalační barvivo, které se nespecificky zabudovává do dvouřetězcové molekuly DNA. Specifitu amplifikovaného produktu tedy musí zaručovat zvolené primery a absence nespecifické amplifikace v reakci. V případě, že i pomocí primerů specifických pro zlom každého pacienta dojde k amplifikaci nespecifických úseků, ať už ve vzorcích patientských či s buffy coaty, je ještě možno tyto nespecifity odlišit na základě odlišné teploty tání amplifikovaného úseku DNA, popřípadě délky produktu na elektroforéze. V případě, že se nespecifity nelze zbavit optimalizací podmínek RQ-PCR, je nutno navrhnout jiné primery či využít pro kvantifikaci místo SYBERGreen hydrolyzační sondy.

Složení reakce

Voda pro injekce	Doplnit do 10 µl
QuantiTect™ SYBR® Green PCR Master Mix (Qiagen)	10 µl
Primery 10 µM	1,0 µl
BSA	0,5 µl
DNA	1 µl

Teplotní profil

1 x	95°C	15 min
50 x	94°C	15 s
	60°C	60 s

Optimalizace probíhaly titrováním množství primerů a teplotního profilu reakce.

7.7.3 RQ-PCR s využitím hydrolyzační TaqMan sondy

Signál detekovaný pomocí hydrolyzačních sond je založen na jiném principu, než je tomu u interkalačního činidla SYBR Green. Hydrolyzační sondy jsou sekvenčně specifické a obsahují zhášec (FAM) a fluorescein (TAMRA). Při nasedání primerů dochází k nasednutí i hydrolyzační sondy ležící mezi oběma primery. V případě amplifikace specifického úseku DNA dojde k odstranění zhášeče polymerázou (ta má 5' → 3' exonukleázovou aktivitu) z blízkosti fluoresceinu a tím generaci signálu, který je pak přímo úměrný množství amplifikované DNA.

Složení reakce

TaqMan 2x Universal PCR Master Mix (No AmpErase® UNG (Applied Biosystems))	12,5 µl
Voda pro injekce	5,25 µl
Primery 10 nM	1,25 µl
Sonda 4 nM	1,25 µl
BSA	1,00 µl
DNA	2,5 µl

Teplotní profil

1 x	95°C	10 min
50 x	90°C	15 s
	62°C	60 s

7.8 Pravidla pro kvantifikaci MRN

Pravidla pro kvantifikaci MRN jsou následující (van der Velden, *et al* 2007):

Hodnoty kalibrační křivky a ředící řady:

- Hodnota korelačního koeficientu $R^2 \geq 0,98$
- Slope (sklon) kalibrační křivky leží v rozmezí -3,1 až -3,9 včetně
- Průměry Ct mezi celými ředěními jsou od sebe vzdáleny 2,6 až 4 cykly včetně
- Průměry Ct mezi meziředěními (5×10^{-4}) jsou od sebe vzdáleny 0,5 až 1,5 cyklu včetně
- Hodnoty Ct v rámci duplikátu (kvadruplikátu) se nesmí lišit o více než 1,5 cyklu

Kvantifikace a senzitivita

- Možnosti kvantifikace a senzitivity jsou určeny hodnotami Ct vzorků ředící řady a buffy coatů
- Kvantifikační rozmezí je stanoveno výše uvedenými pravidly
- Senzitivitou se rozumí nesplnění výše uvedených podmínek, nicméně dochází k amplifikaci specifických úseků:
 - V posledním ředění (které je považováno za hranici senzitivity) dojde k amplifikaci specifického úseku pouze v jednom vzorku z duplikátu
 - Duplikáty nesplňují rozmezí rozdílu Ct
 - Rozdíl Ct mezi ředěními nesplňuje výše uvedené podmínky
 - Vzorek z duplikátu má Ct > 20 cyklů od neředěného vzorku nebo průsečíku kalibrační křivky
- Pacientské vzorky jsou kvantifikovatelné v případě, že se hodnoty Ct v rámci triplikátu neliší o více než 1,5 cyklu a průměr těchto Ct je menší, nežli nejvyšší Ct vzorku ředící řady, v rámci něhož je možno ještě kvantifikovat
- Pacientský vzorek je *slovně* hodnocen jako pozitivní:
 - Hodnoty Ct v rámci triplikátu se liší o více než 1,5 cyklu
 - K amplifikaci nedošlo ve všech vzorcích triplikátu
 - Průměr Ct triplikátu leží za kvantifikačním rozmezím
 - Pacientské Ct leží maximálně 4 cykly za hranicí senzitivity systému
 - V případě, že dojde k amplifikaci nespecifických úseků (vzorky buffy coatů, jejich Ct musí být minimálně o 3 cykly vyšší než kvantifikační rozmezí) a hodnota pacientského Ct je minimálně o 1 menší než hodnota Ct buffy coatu
- Pacientský vzorek je *slovně* hodnocen jako negativní:
 - Všechny vzorky z triplikátu jsou negativní
 - Ct pacientského vzorku leží více než 4 cykly za senzitivitou
 - V případě, že dojde k amplifikaci nespecifických úseků (vzorky buffy coatů) a hodnota pacientského Ct je méně než o 1 cyklus nižší než Ct buffy coatů či vyšší.

7.9 Měření MRN na základě přestaveb pro Ig/TCR

Princip této metody se opírá o unikátní DNA sekvenci, která vzniká při přestavbě genů pro Imunoglobuliny a T-buněčné receptory. Při V(D)J rekombinaci jsou mezi příslušné segmenty inzertovány náhodné nukleotidy, které za fyziologických okolností zvyšují variabilitu antigen vazebného místa příslušných receptorů. V diagnostice se těchto unikátních sekvencí využívá pro kvantifikaci leukemických buněk.

U pacientů s CML se toto vyšetření neprovádí, u pacientů s ALL s postiženými B-lymfocyty jsou vyšetřovány ne/kompletní V(D)J přestavby těžkých Ig řetězců (IgH), delece lehkého řetězce kappa (IGK), nekompletní přestavby T- buněčného receptoru delta (TCR δ) a gama (TCR γ).

Klonálně specifická přestavba je hledána pomocí standardně používaného setu primerů (van Dongen, *et al* 2003):

- Kompletní IgH:
 - forward primery: VH1/7, VH2, VH3, VH4, VH5, VH6
 - reverse primer: JHcons
- Nekompletní IgH:
 - Forward primery: DH1, DH2, DH3, DH4, DH5, DH6 (tyto jsou multiplexovány DH1-6) a DH7
 - Reverse primer: JHcons
- Nekompletní TCR δ
 - Forward primery: V δ 2 a D δ 2
 - Reverse primer: D δ 3
- TCR γ
 - Dvojice: V γ I-J γ 1.1, V γ I-J γ 1.3, V γ II-J γ 1.1, V γ II-J γ 1.3, V γ IV-J γ 1.1, V γ IV-J γ 1.3

Složení reakce:

Voda pro injekce	17,05 μ l
10 x PCR buffer II (Applied Biosystems, USA)	2,5 μ l
MgCl ₂ 25 mM (Applied Biosystems, USA)	1,5 μ l
dNTP mix 10mM (Applied Biosystems, USA)	2,0 μ l
AmpliTaQ Gold® DNA polymeráza (5 U/ μ l) (Applied Biosystems, USA)	0,2 μ l
Primery (à 0,625 μ l)	1,25 μ l
DNA	0,5 μ l

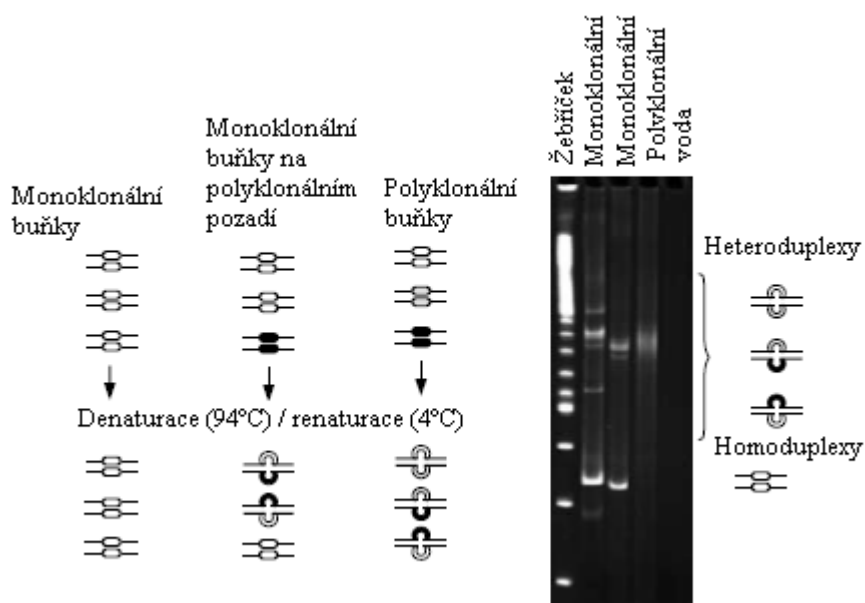
Teplotní profil:

1 x	50°C	2 min
1 x	95°C	10 min
50 x	95°C	15 s
	60°C	1 min
	15°C	nekonečno

Použité přístroje:

iCycler IQ™ (Applied Biosystems, USA)

Teplotní profil reakce je upraven pro nalezení heteroduplexů. V případě, že v PCR reakci dojde k amplifikaci jednoho cíle, bude po analýze heteroduplexů na elektroforéze viditelný pouze jeden pruh. Pokud je amplifikováno více cílů, vzniknou při denaturaci a následné renaturaci vedle homoduplexů i heteroduplexy (viz Obrázek 6), které jsou následně vizualizovány pomocí kapilární elektroforézy na přístroji Agilent 2100 Bioanalyzer.



Obrázek 6 Princip heteroduplexní analýzy; převzato a upraveno podle (van Dongen, *et al* 2003)

7.9.1 Agilent 2100 Bioanalyzer

Pomocí přístroje Agilent 2100 Bioanalyzer lze provést čipovou kapilární elektroforézu.

Použité přístroje:

Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA)

Priming station (HPST)

DNA LabChip (Agilent Technologies, USA)

2100 expert software (Agilent Technologies, USA)

Eppendorf Mini Spin, poloměr rotoru 4,9 cm (Eppendorf, Německo)

IKA® MS3 Vortexer (Agilent Technologies, USA)

Použité reagencie:

Agilent DNA 1000 kit

Pracovní postup:

Příprava DNA čipu a nanášení vzorků vždy probíhalo podle návodu výrobce.

7.9.2 Příprava pacient-specifických primerů a měření MRN

Monoklonální přestavby identifikované kapilární elektroforézou byly sekvenovány a analyzovány (viz kapitola 7.5). Při detekci Ig/TCR klonálních přestaveb jsou předem dány reverzní primery i sondy určené k detekci MRN pomocí RQ-PCR. Pomocí systému Vector NTI jsou navrhovány pouze forwardové ASO primery. Tyto primery minimálně 4 – 5 nukleotidy zasahují do oblasti V(D)J zlomu, kde došlo k náhodné inzerci nukleotidů. ASO primery byly navrhovány tak, aby měly podobnou T_m jako reverzní primery ($\sim 55^\circ\text{C}$), T_m fluorescenčně značených sond se pohybovala přibližně o 10°C výše. ASO primery měly délku v rozmezí 18 – 25 nukleotidů, u každého z nich byla zkontrolována tvorba dimerů a vlásenek.

Již dříve byly publikovány sekvence reverzních primerů a fluorescenčních sond používaných pro měření MRN Evropskou pracovní skupinou pro ALL ESG-MRD-ALL (Langerak, *et al* 2001, van der Velden, *et al* 2002a, van der Velden, *et al* 2002b, Verhagen, *et al* 2000).

Reverzní primery:

IgH: R-JH1-intron, R-JH2-intron, R-JH3-intron, R-JH4-intron, R-JH5-intron, R-JH6-intron

TCR γ : R-JG1.1/2.1-cons1, R-JG1.3/2.3-cons2

TCR δ : R-DD3-cons4, R-JD1-cons1, R-JD1-cons2

IGK-Kde: R-KDE-cons2

Sondy (hydrolyzační):

IGH: T-JH1.2.4.5-cons1, T-JH3-cons1, T-JH6-cons2

TCR γ : T-JG1.3/2.3-cons3, Tr-JG1.1/2.1-cons1

TCR δ : T-DD3-cons2, T-JD1-cons1

IGK-Kde: T-KDE-cons1

Měření MRN následně probíhalo pomocí schématu popsaného v kapitole 7.7.3, analýza MRN probíhala podle pravidel uvedených v kapitole 7.8. Pro dosažení co nejvyšší senzitivity a specifity systému byl tento případně optimalizován pomocí změny koncentrace primerů či teplotního profilu RQ-PCR. V prvním kole dochází k optimalizaci ředící řady s využitím TaqMan 2x Universal PCR Master Mix No AmpErase® UNG (Applied Biosystems) (viz kapitola 7.7.3), v případě neuspokojivých výsledků se přistupuje k optimalizacím pomocí AmpliTaq Gold® DNA polymerázy (Applied Biosystems, USA).

Použité přístroje

iCycler™ Real-Time PCR Detection System (Biorad, USA)

ABI PRISM® 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA)

Teplotní profil

1 x	50°C	2 min
1 x	95°C	10 min
50 x	95°C	15 s
	62°C	1 min
	15°C	nekonečno

7.10 Měření MRN na základě hladiny BCR/ABL mRNA

7.10.1 Izolace celkové RNA z leukocytů modifikací dle Trizolu

Principem této metody je převedení RNA ze vzorku do vodné fáze, čehož se dosáhne úpravou pH vzorku, z něhož je RNA izolována. RNA je nejdříve stabilizována roztokem guanidiniumisothiokyanátu a 2-merkptoethanolu, pH je upraveno pomocí acetátu sodného. Následným přidáním fenolu a chloroformu a centrifugací je RNA převedena do vodné fáze, zatímco DNA bude ve fázi fenolové (při zásaditém pH by tomu bylo naopak). Precipitace RNA je docílena odebráním vodné fáze a přidáním propanolu (při -20 °C). Po centrifugaci takového roztoku je získána peleta, kterou lze purifikovat etanolem.

Použité reagensie

2-merkptoethanol

Roztok ITG (viz kapitola 7.2.1)

2M Acetát sodný, pH4

Fenol

Chloroform-isoamylalkohol (98 % chloroformu + 2 % isoamylalkoholu)

Isopropanol

75% etanol

Použité přístroje

Centrifuga Heraeus Multifuge 3 S-R,

microliter rotor 24x1.5/2 ml (DJB Labcare, UK)

Vortex Yellow line TTS 2 (IKA®, Německo)

Minicentrifuga Labnet-Spectrafuge™ Mini, stolní centrifuga (Sigma-Aldrich, USA)

Termoblok Labnet – AccuBlock™ Digital Dry Bath (Labnet International, Inc., UK)

Pracovní postup

Vzorky určené k izolaci byly umístěny do mrazáku o teplotě -20 °C, před začátkem izolace se centrifuga ponechala chladit na 4 °C. S každým vzorkem se manipulovalo pouze jednou rukou, vždy s jinou rukavicí, aby nedošlo ke kontaminaci vzorků.

Ke zmrzlé peletě buněk bylo přidáno 500 µl ITG s merkptoethanolem (1 ml ITG + 7,2 µl merkptoethanolu), vzorek byl 1 minutu vortexován. V případě, že bylo ve vzorku méně než 2 miliony buněk, bylo přidáno 10 µl glykogenu. Pokud bylo buněk méně než jeden milion, přidávalo se ke vzorku pouze 100 µl ITG s merkptoethanolem a 10 µl glykogenu.

Takto upravené vzorky se 5 minut inkubovaly na ledu. Následně bylo přidáno 50 µl acetátu sodného, vzorky se 1 minutu vortexovaly. K promíchaným vzorkům bylo přidáno 455 µl fenolu a 130 µl chloroform-isoamylalkoholu. Po otáčení vzorku v ruce až do mléčného zakalení byly vzorky 2-3 minuty inkubovány na ledu. Dále byly vzorky centrifugovány 15 minut při 12 741 rpm a 4 °C.

Z centrifugovaných vzorků byla postupně po 100 µl odebírána vodná fáze (v ideálním případě je ve vzorku á 500 µl vodné a fenolové fáze) do sterilních zkumavek, poté byl ve stejném poměru přidán isopropanol. S ním byl vzorek 30 minut inkubován v mrazáku při -20 °C. Po inkubaci byly vzorky centrifugovány 15 minut při 12 741 rpm a 4°C.

Ze vzorků byl opatrně slit supernatant, zkumavky byly osušeny o sterilní filtrační papír. K peletě byl přidán 1 ml 75% etanolu a otočením zkumavky bylo dosaženo odlepení pelety ode dna zkumavky. Následně se vzorky nechaly centrifugovat 5 minut při 10 146 rpm a 4 °C. Opět došlo ke slití supernatantu a osušení zkumavek. Vzorky byly stočeny na stolní

centrifuze a pipetou byl odsán zbytek etanolu. Pro úplné zbavení se etanolu byly zkumavky ponechány otevřené na vzduchu po dobu 10 – 15 minut.

Peleta byla rozpouštěna ve vodě, s ohledem na množství buněk ve vzorku (k 10 milionům, 4-2 milionům, a <2 milionům bylo přidáno 50 μ l, 25 μ l respektive 12 μ l vody). Zkumavky byly jemně vortexovány a ponechány 10 minut při 55 °C v termobloku. Izolovaná RNA je skladována v -80 °C.

7.10.2 Reverzní transkripce

Při reverzní transkripci dochází k přepisu získané RNA do komplementární dsDNA (cDNA). Takto získanou cDNA lze dále využít k PCR reakcím. K reverzní transkripci je standardně využíván iScript™ cDNA Synthesis Kitu (BioRad, USA). Při jeho použití bylo postupováno dle návodu výrobce (včetně teplotního profilu). Do jedné reakce bylo přidáno tolik RNA, aby výsledné množství v reakci bylo 1000 ng. Koncentrace RNA byla měřena pomocí NanoDrop® ND-1000. Jako kontrola kvality izolované RNA sloužila její vizualizace pomocí kapilární elektroforézy na přístroji Agilent 2100 Bioanalyzer s využitím RNA LabChipu.

Použité přístroje

Vortex Yellow line TTS 2 (IKA, Německo)

Termobloky Labnet-Accublock™ Digital Dry Bath (Labnet International, Inc., UK)

Minicentrifuga Labnet-Spectrafuge Mini, stolní centrifuga (Sigma – Aldrich, USA)

7.10.3 Měření exprese kontrolního genu pro glukuronidázu (GUS) a genu pro BCR/ABL

Kvantifikace exprese obou těchto genů spočívá na stejném principu. Ke kvantifikaci slouží komerční ředící řady (FusionQuant® KITS, Ipsogene, Francie), a již dříve publikované primery a hydrolyzační sondy (Beillard, *et al* 2003, Gabert, *et al* 2003). Ředící řada pro GUS sestává z ředění, označovaných jako 10^3 , 10^4 a 10^5 , kde ředění 10^3 obsahuje 200 kopií kontrolního genu v 1 μ l. Ředící řady pro minor i Major variantu BCR/ABL sestávají z jednotek 10^1 – 10^3 , 10^5 a 10^6 , kde hodnota 10^1 odpovídá 2 kopiím na 1 μ l kitu. Pacientské vzorky i vzorky ředící řady jsou měřeny v duplikátech.

Složení reakce:

Voda pro injekce	7,75 µl
2x Buffer TaqMan Master mix (Invitrogen, USA)	12,50 µl
Primer (10 µM)	á 0,75 µl
Sonda (4 µM)	1,25 µl
DNA	2,00 µl

Teplotní profil:

1x	95 °C	10 min
50x	95 °C	15 s
	60 °C	60 s

7.11 Konečné stanovení MRN na základě výsledků RQ-PCR

V případě měření MRN, které využívá genomickou DNA (gDNA), musí být množství detekovaných leukemických buněk (~DNA) porovnáno s celkovým množstvím buněk (DNA) v reakci. Konečná hladina reziduální nemoci je tedy podílem koncentrace specificky amplifikované gDNA a koncentrace získané měřením kontrolního genu pro albumin.

U měření MRN pomocí cDNA se k výsledné hladině MRN dojde pomocí dvou kroků. Prvním je opět podíl koncentrace specificky amplifikované cDNA fúzního genu a koncentrace cDNA pro kontrolní gen (glukuronidázu) (pro přirozenější formát výsledného čísla vynásobený 1 000 x, neboť exprese glukuronidázy je v buňkách výrazně vyšší). Při měření specifické amplifikace gDNA je hladina cílového genu již v rámci pokusu porovnávána s diagnostickým/relapsovým vzorkem. U cDNA metody se tento přepočet provádí až *ex post* (ředící řada není tvořena z diagnostického materiálu daného pacienta, ale z plazmidových vzorků dané koncentrace) a pro stanovení hladiny MRN tedy musíme znát i hladinu exprese v diagnostickém vzorku. Konečná hladina MRN je tedy podílem poměru hladin cDNA cílového a kontrolního genu ku stejnému poměru z diagnostického (případně relapsového) vzorku.

7.12 Analýza oblastí zlomů

Repetitivní sekvence byly hledány pomocí serveru Repeat Masker v. 4.0.3. (Institute for Systems Biology www.repeatmasker.org). Kryptické RSS a mikrohologie byly vyhledávány na základě získaných bioinformatických dat. Jako kryptické RSS jsou označovány sekvence, které se od konsensus sekvence 5' CACAGTG N(12,23) ACAAAAACC 3' liší nejvíce v devíti nukleotidech, přičemž triplet CAC musí být vždy přítomen (Score, *et al* 2010). Tato RSS mohla mít i reverzní orientaci.

8 Výsledky

8.1 Detekce zlomů a měření MRN

Celkem bylo ke hledání zlomů na genomické úrovni využito 27 diagnostických či relapsových vzorků a buňky tří buněčných linií (K562, JURL, SupB15). Dvanáct pacientů mělo zlomy v Major oblasti, 15 bylo pozitivních na minor přestavbu. Minimální reziduální nemoc byla změřena u 197 vzorků. Ze závěrečné analýzy byly vyjmuty vzorky, které byly negativní všemi třemi metodami (celkem 58 vzorků). U jednoho pacienta s Major zlomem (dospělý), nebyla změřena reziduální nemoc pomocí Ig/TCR přestaveb, zbývajících metodami byla jeho MRN stanovena jako negativní u 11 z 15 vzorků. Za nekorelující výsledky byly považovány ty, které se v rámci vzorku lišily o více než jeden řád.

Pro porovnatelnost metod a grafickou přehlednost byly s ohledem na citlivost metod „*nízce pozitivní*“ (= pozitivní pod hladinou spolehlivé kvantifikace) a *negativní* výsledky nahrazeny číselnou hodnotou 1,00E-04, respektive 1,00E-05.

8.1.1 Major oblast

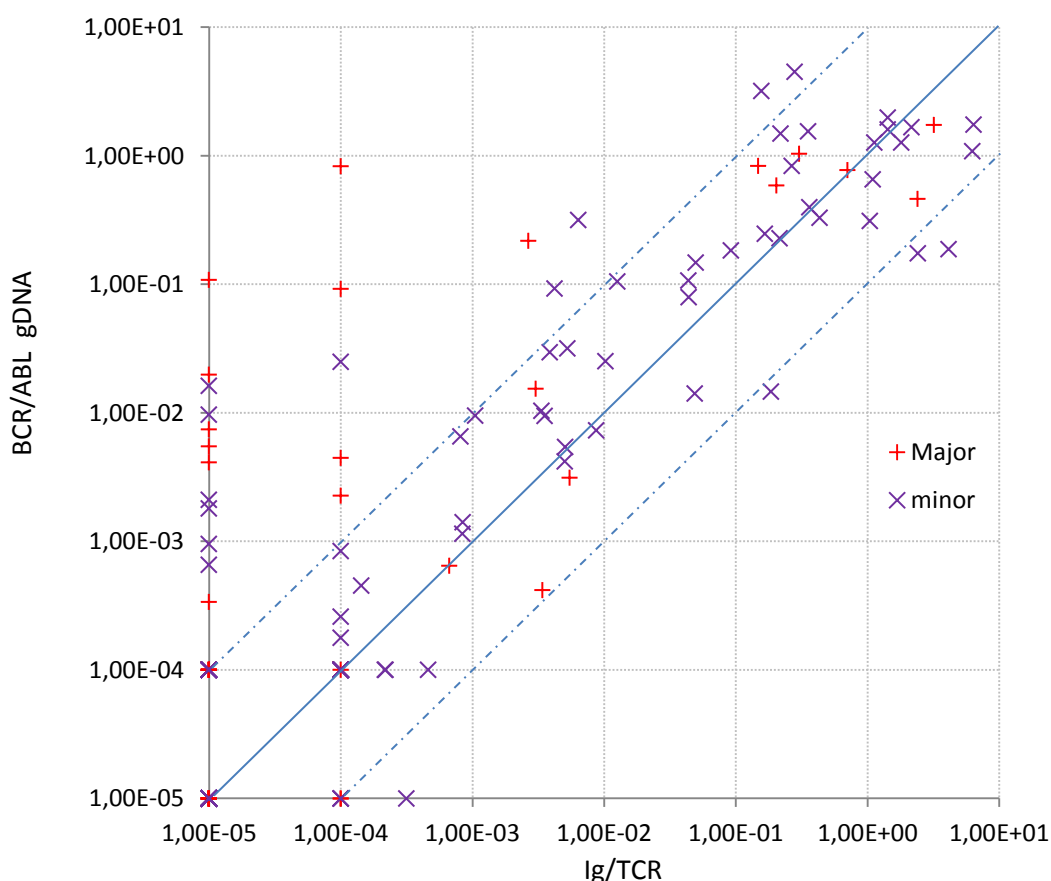
Mezi pacienty s Major zlomy byli 4 pacienti s CML, 6 pacientů s ALL bylo dospělých, 2 byly děti. V této skupině se podařilo nalézt a osekvenovat zlom u 8 pacientů (~ 67 %; 2 dospělí a 2 děti s ALL; 4 CML pacienti), u 1 pacienta došlo ke specifické amplifikaci, avšak přechodovou oblast se zatím osekvenovat nepodařilo. U dvou pacientů, u nichž zlom nebyl nalezen v prvním kole LD-PCR, nebylo možno pokračovat v optimalizaci reakce pro nedostatek jejich biologického materiálu. U jednoho z pacientů se specifický BCR/ABL produkt v LD-PCR ani opakovaně naamplifikovat nepodařilo, přestože měl dostatek materiálu i kvalitní DNA (v kontrolní amplifikaci gDNA bylo možno detekovat i nejdelší produkt o délce 12 kb). Mezi buněčnými liniemi se podařilo nalézt zlom u buněk K562; u DNA z buněk linie JURL byla nalezena specifická amplifikace, avšak osekvenovat zlom se zatím nepodařilo.

U tří pacientů, u kterých byla nalezena přechodová sekvence, byly k dispozici pouze diagnostické vzorky. U zbývajících pěti byla změřena reziduální nemoc. Změřeno bylo 63 vzorků, z nichž 25 bylo negativních všemi metodami. Analýza tedy byla provedena u 38 vzorků, z nichž 4 vzorky byly změřeny pouze pomocí detekce exprese BCR/ABL a přechodové sekvence tohoto genu (3 byly pozitivní oběma metodami a 1 byl pozitivní pouze stanovením MRN na genomické úrovni).

Z 34 vzorků bylo 10 (29 %) negativních pomocí detekce Ig/TCR, zatímco zbývajících dvěma metodami byla MRN pozitivní; 1 z těchto vzorků byl negativní při měření MRN pomocí exprese BCR/ABL, zatímco metodami založenými na genomické DNA byl naměřen jako pozitivní. U dvou vzorků byla MRN pozitivní pouze při měření Ig/TCR přestaveb. Šest vzorků bylo na základě BCR/ABL gDNA označeno za pozitivní, zatímco zbylými metodami se MRN ukázala jako negativní. Zbylé vzorky (44 %) byly pozitivní pomocí všech tří metod.

U CML pacientů bylo 11 vzorků (31% z celkových 36 změřených) negativních detekcí Ig/TCR přestaveb, zatímco alespoň 1 metodou zaměřenou na BCR/ABL byla MRN detekována.

Při porovnání detekčních metod Ig/TCR a BCR/ABL gDNA (viz Obrázek 7) bylo za nekorelující vzorky považováno 23 (67,6%), přičemž 18 z nich náleželo CML pacientům.

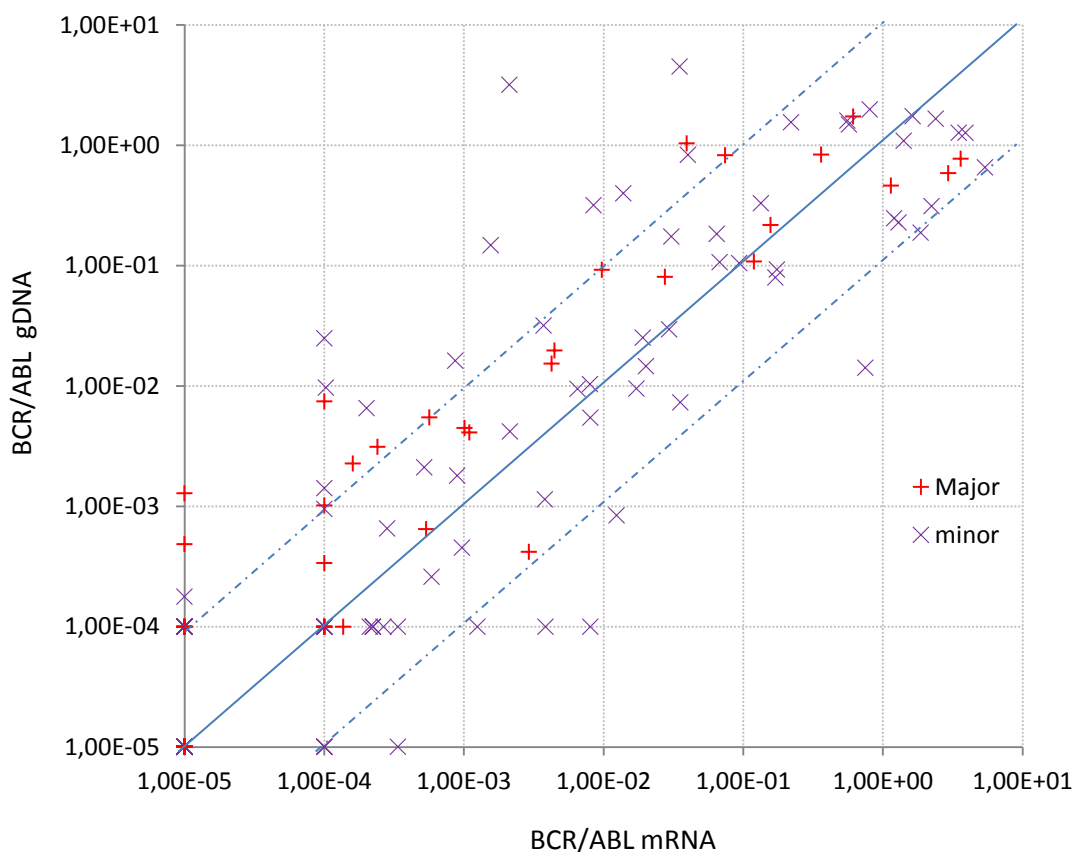


Obrázek 7 Graf korelace mezi genomickými metodami; čerchovaná čára označuje hranici, kdy jsou vzorky považovány za korelující; Major a minor označují příslušné vzorky

Šestnáct vzorků (47,1 % z celkového počtu) bylo Ig/TCR negativních a BCR/ABL pozitivních (11 z nich patřilo CML pacientům). Vyšší hodnoty získané metodou Ig/TCR

byly zaznamenány pouze u 2 vzorků (oba u CML pacientů – Ig/TCR pozitivní a gDNA negativní).

Porovnáním metod měření exprese BCR/ABL a hladiny BCR/ABL na genomické úrovni bylo nalezeno 13 (36 %; 7 z nich patřilo CML pacientům) nekorelujících výsledků z celkových 36, které byly pozitivní alespoň jednou z metod. U všech nekorelujících vzorků byla hladina gDNA vyšší než MRN naměřená pomocí transkripce genu BCR/ABL a 6 vzorků bylo gDNA pozitivních a mRNA negativních (viz Obrázek 8).



Obrázek 8 Graf korelace metod založených na detekci BCR/ABL přestaveb; Major a minor označují příslušné vzorky

8.1.2 Minor oblast

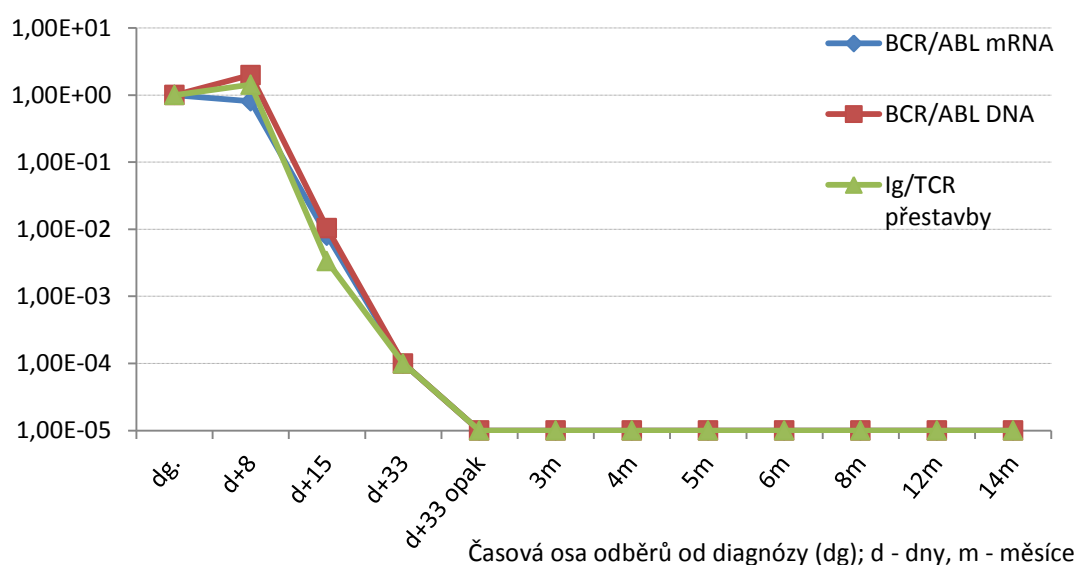
Z patnácti pacientů (žádný z nich nebyl dospělý) se zlomy v minor oblasti se podařilo nalézt zlom u 12 pacientů (80 %). U jednoho pacienta došlo ke specifické BCR/ABL amplifikaci, avšak nepodařilo se zatím osekvenovat zlom. U dvou pacientů, u kterých bylo specifické LD-PCR negativní, bylo provedeno kontrolní LD-PCR. Výsledky u jednoho z nich ukázaly na nepříliš kvalitní DNA jako možný důvod neúspěchu (maximální délka

kontrolního produktu byla 5 kbp) u druhého došlo k amplifikaci i nejdelšího možného produktu (12 kbp).

Jeden pacient s nalezeným intronovým přechodem BCR/ABL měl k dispozici pouze diagnostický vzorek, u jednoho z pacientů teprve optimalizujeme RQ-PCR. U deseti pacientů byla změřena reziduální nemoc. U buněk linie SupB15 se nám dosud zlom nalézt nepodařilo.

Celkem byla MRN změřena u 135 vzorků, z nichž bylo 44 negativních všemi třemi metodami. Dvanáct vzorků (13 %) ze zbývajících 91 bylo negativních při měření MRN detekcí přestaveb pro Ig/TCR, zatímco alespoň jednou ze zbývajících metod bylo měření pozitivní. U dvou vzorků stála naopak pouze metoda monitorování Ig/TCR za pozitivním výsledkem MRN. Při měření MRN na základě BCR/ABL mRNA byly pouze touto metodou označeny jako *negativní* 7 vzorků a jako *pozitivní* 4 vzorky. BCR/ABL gDNA byla jedinou metodou s pozitivním výsledkem u 8 vzorků a jedinou s negativním ve dvou případech.

Příklad průběhu MRN u pacienta s téměř optimální korelací všech tří metod znázorňuje Obrázek 9.



Obrázek 9 Průběh MRN u pacienta s téměř optimální metodologickou korelací

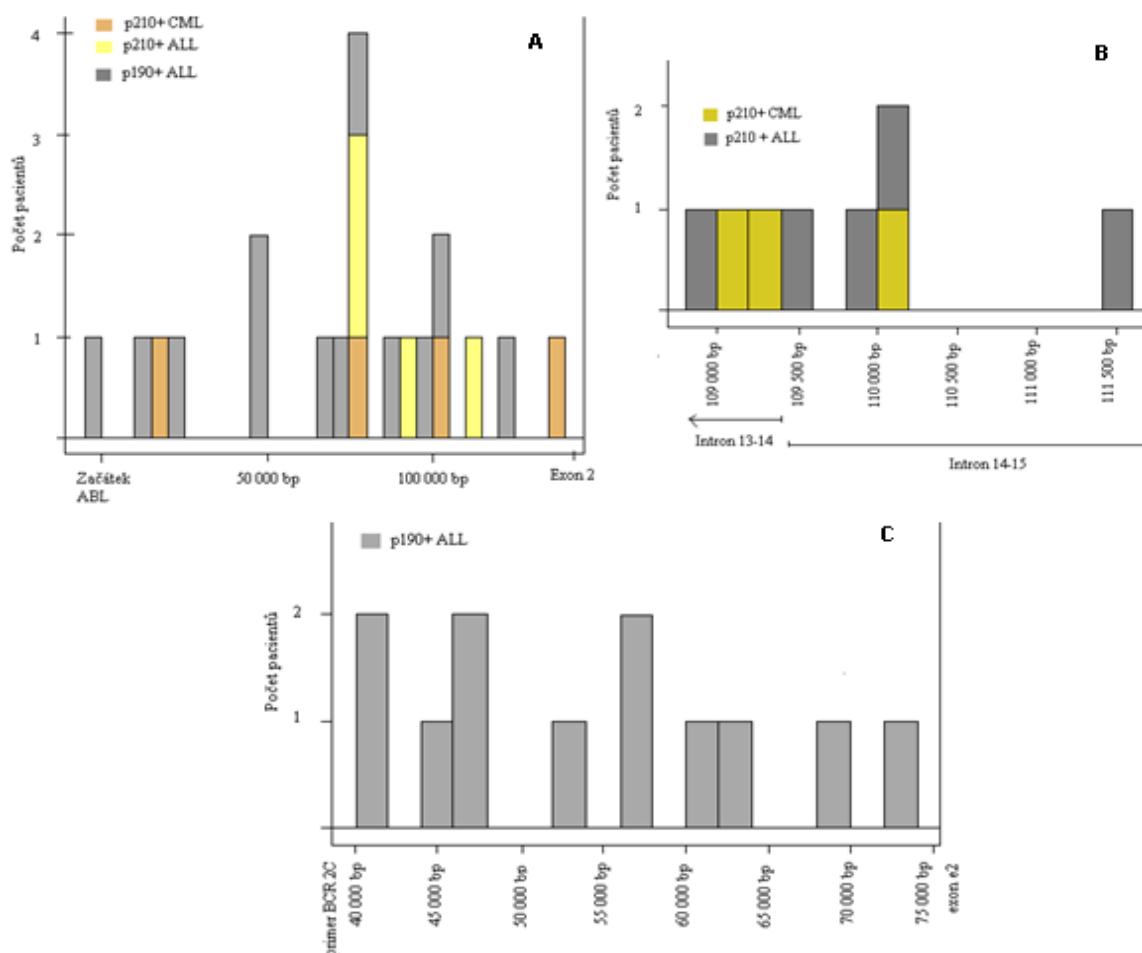
U pacientů s minor přestavbami spolu na DNA úrovni nekorelovalo 31 (38,7%) z 80 vzorků, které byly alespoň jednou z metod zaměřených na gDNA pozitivní, z toho u 25 měla MRN vyšší hodnotu pomocí BCR/ABL gDNA, přičemž Ig/TCR

negativních z nich bylo 17 (21 %). Zbývajících šest vzorků patřilo pouze 2 pacientům, a gDNA BCR/ABL negativní byla tři měření (viz Obrázek 7).

V rámci porovnávání BCR/ABL detekčních metod bylo nekorelujících 36 vzorků (40,9 %) z 88, které byly pozitivní alespoň jednou z metod. Vyšší hodnoty na gDNA úrovni byly získány u 25 vzorků, přičemž negativních na mRNA úrovni bylo 15 z nich. Pozitivních výsledků pouze na mRNA úrovni bylo celkem 5 – tato měření se vyskytovala u dvou pacientů (viz Obrázek 8).

8.2 Clusterování zlomů

V žádné ze zkoumaných oblastí (ABL, minor a Major BCR) nebylo pozorováno žádné výraznější clusterování (viz Obrázek 10), což je konzistentní s již dříve publikovanými pracemi (Burmeister, *et al* 2011, Score, *et al* 2010, Zhang, *et al* 1995).



Obrázek 10 Místa zlomů: **A** - gen ABL; **B** - Major BCR; **C** - minor BCR

Mikrohomologie (viz Obrázek 11; v rozsahu 1 – 3 báze) byly nalezeny u 9 z 20 pacientů (45 %), tři z nich nesli Major přestavbu (všichni byli diagnostikováni s ALL). Jeden z p210⁺ ALL pacientů měl mezi zlomem na BCR straně a očekávanou sekvencí na ABL straně inzerci o délce 153 bp. Jednalo se o invertovaný úsek genu ABL, který se nachází přibližně 30 kbp downstream od očekávané sekvence.

U čtyř pacientů došlo ke zlomu v Alu sekvenci (1 na BCR straně). Jiné repetitivní sekvence (LINE, SINE, LTR elementy, DNA elementy, anebo jednoduché repetece), ve kterých došlo ke zlomu na BCR či ABL straně, byly nalezeny u 10 pacientů (5 s Major přestavbou). Stejný druh repetitivních sekvencí na BCR a ABL straně však nebyl nalezen u žádného z pacientů. Kryptické RSS, forwardové či reverzní, začínající v maximální vzdálenosti 10 bp od zlomu, byly nalezeny u 9 pacientů (45 %; 2 z nich byli p210⁺). RSS sekvence z obou stran zlomu se vyskytovaly u 2 pacientů (jeden p210⁺), v obou případech měly RSS stejnou orientaci.

BCR	<u>TTTCTAATTTTCCTCGAGACTTCCTTTTTCATCTGTGGATCATTTAGTA</u>
BCR/ABL	<u>TTTCTAATTTTCCTCGAGACTTCCTTTTAAATTTAGCAAAGTAAAAGA</u>
ABL	ATACATGTTAATTGTGGAAAAAAATTTAAATTTAGCAAAGTAAAAGA

Obrázek 11 Mikrohomologie u jednoho z pacientů o délce 3 bp

9 Diskuze

Při měření MRN u ALL pacientů by spolu v ideálním případě měly korelovat všechny používané metody. V případech, kde tomu tak není, je nutné posoudit, co je důvodem odlišností a jaké jsou jejich klinické konsekvence – jedná se pouze o nepřesnost jednotlivých metod nebo mají rozdíly nějaký biologický význam? Jakou metodu/hladinu MRN máme brát v úvahu při rozhodování o léčbě pacienta?

V případě leukémií s fúzním genem BCR/ABL jsou tyto otázky zvláště důležité, protože se jedná o pacienty se špatnou prognózou a jak ukazuje naše práce, nekorelace jsou tu skutečně časté. Perfektní korelace u všech vyšetřených vzorků se v našem souboru vyskytla pouze u jednoho pacienta (viz Obrázek 9). Již dříve byla popsána nekorelace mezi MRN hodnotami, které byly získány detekcí klonálních přestaveb pro Ig/TCR a exprese BCR/ABL (Zaliova, *et al* 2009). Z vyšetřených vzorků bylo pozitivních pouze mRNA metodou 20 % (vs. 3 % Ig/TCR) a u 20 % double pozitivních vzorků byla získána vyšší hodnota MRN měřením mRNA (vs. 10 % vyšších Ig/TCR hodnot). Za touto diskrepancí stojí pravděpodobně přítomnost BCR/ABL fúze i v jiných buňkách, než jsou ty, které jsou v rámci diagnostiky sledovány - ať už se jedná o buňky lymfoidní, myeloidní a/nebo prekurzorové. Tento přístup, kdy je porovnávána exprese fúzního genu a stanovení přestaveb na DNA úrovni, však nedokáže odlišit situace, kdy je fúze přítomna ve větším klonu než Ig/TCR přestavba, od situace, kdy se vyskytují oba cíle ve stejných buňkách, ale exprese mRNA je v nich výrazně zvýšena (a naopak). Doplnění monitorování hladiny fúze na gDNA úrovni diagnostické možnosti významně zvyšuje.

Na základě těchto publikovaných dat jsme předpokládali rozdíly hodnot MRN získané pomocí genomických metod. Důvody pro možné diskrepance jsou totiž kromě různé exprese prakticky stejné, tedy především přítomnost BCR/ABL v širším klonu. U pacientů s Major přestavbou byla častěji naměřena Ig/TCR negativita (47 % vs. minor pacienti 21 %) u BCR/ABL gDNA pozitivních vzorků. Za tímto rozdílem stojí převážně pacienti diagnostikovaní s CML, u kterých je tato diskrepance očekávána, neboť u tohoto onemocnění je z definice zřejmé, že jsou postiženy jak myeloidní buňky, tak buňky prekurzorové. U ALL pacientů by však spolu tato dvě měření měla teoreticky korelovat. Nicméně, jak je uvedeno výše, stoprocentní korelace byla nalezena pouze v jednom případě (pacient s minor přestavbou) z celého souboru pacientů. Ostatní výsledky ukazují na postižení jiného subklonu, než který je detekován metodou kvantifikace Ig/TCR přestaveb, či na postižení i jiných než lymfoidních buněk. V navazující studii budeme tyto diskrepantní vzorky u pacientů s dostatkem buněčného materiálu sortovat na průtokovém cytometru

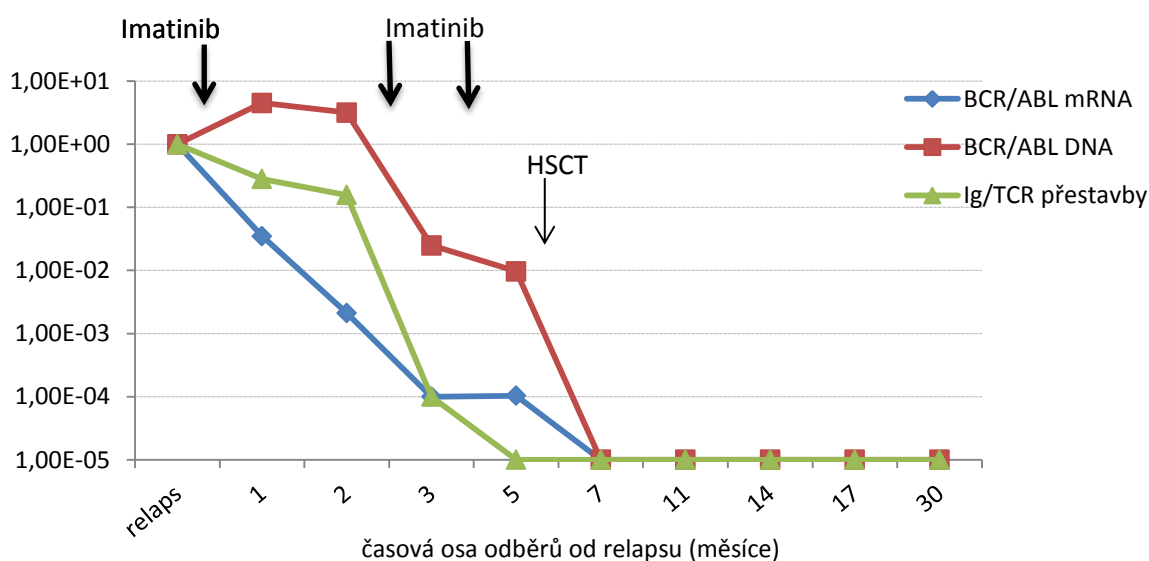
a zjišťovat, které buněčné populace nesou aberantní chromozom v jaké míře. Již dřívější výsledky poukázaly na možnost horší prognózy pro pacienty s postižením nejen lymfoidní řady (Zaliova, *et al* 2009). Konkrétnější závěry – statisticky relevantní – lze však vyvodit až při analýze většího počtu pacientů. Tito nám budou k dispozici, neboť naše laboratoř je zapojena do léčebného protokolu EsPhALL, do kterého jsou zařazováni pacienti z několika evropských zemí. Další práce tedy ukáže, zda se prognóza pro Ph⁺ ALL pacienty liší v závislosti na postižení myeloidní řady či časných hematopoetických prekurzorů. Naše současné výsledky poukazují na možnost postižení ne-lymfoidní linie jak u pacientů s Major, tak minor přestavbami.

Již dříve byly publikovány články zaměřené na monitorování MRN detekcí exprese BCR/ABL a hladiny gDNA (Bartley, *et al* 2010, Ross, *et al* 2010), avšak pouze u CML pacientů (celkem bylo změřeno 73 vzorků). Už tyto studie ukázaly, že metoda opírající se o gDNA je senzitivnější a že i mRNA negativní MRN výsledky mohou být pozitivní změřením genomické hladiny BCR/ABL.

V našem souboru pacientů s Major BCR/ABL přestavbou bylo nalezeno 36 % vzorků, které se lišily o více než jeden řád. Všechny tyto vzorky měly vyšší hladinu na gDNA úrovni a více než polovina z nich náležela CML pacientům; 18 % bylo na gDNA úrovni single pozitivní. Mezi pacienty s minor přestavbami spolu takto nekorelovalo 41 % výsledků, 28 % mělo vyšší hladinu gDNA a 17 % bylo gDNA single pozitivních. Na mRNA úrovni bylo single pozitivních vzorků 6%. Na základě těchto pozorování vyvstává otázka, proč by se měly výsledky získané těmito dvěma způsoby měření lišit. Při srovnatelné citlivosti obou metod je na prvním místě metodologický rozdíl mezi měřením exprese genu a jeho DNA, jak je zmíněno výše. Z tohoto důvodu nemusí být nízká pozitivita na gDNA úrovni a negativita detekce mRNA tak překvapující – transkripce leukemických buněk může být zvláště v průběhu terapie negativně ovlivněna. Práce ze studií zaměřených na chronické myeloidní leukémie (Brazier, *et al* 2002, Ross, *et al* 2006, Schoch, *et al* 2002) naznačují, že by konkrétně imatinib (či další kinázové inhibitory) mohl snižovat expresi fúzního genu BCR/ABL, i když dosud není zcela jasné, jakým způsobem. Žádné podobné práce na poli akutní lymfoblastické leukémie dosud nebyly prezentovány. V naší skupině pacientů byla významně nižší exprese BCR/ABL (ve srovnání s gDNA) minimálně ve dvou po sobě následujících vzorcích pozorována u 6 pacientů (4 s ALL, 2 s CML). U pěti z nich je tato diskrepance mezi vysokou DNA pozitivitou a nízkou expresí skutečně vysvětlitelná současnou terapií kinázovým inhibitorem, pouze dva takto nekorelující vzorky od jedné

z pacientek s ALL spadají do období těsně před nasazením imatinibu. Ukázka průběhu MRN u jednoho z pacientů s ALL popisuje Obrázek 12.

Naopak mRNA single pozitivita je očekávána méně, teoreticky může být vysvětlena samozřejmě buď technickou chybou měření nebo zvýšenou expresí ve velmi malém, na gDNA úrovni obtížně detekovatelném klonu BCR/ABL-pozitivních buněk. Již v dřívějších pracech bylo také publikováno, že buňky v rámci diferenciaci odlišně exprimují gen BCR/ABL (ukázáno na CML buňkách) (Bedi, *et al* 1993).



Obrázek 12 ALL pacient s klesající expresí BCR/ABL a přetrvávající vysokou pozitivitou na genomické úrovni. Šipky označují období, kdy byl podáván imatinib.

Při analýze přechodových oblastí se naše výsledky shodovaly s již dříve publikovanými studiemi, a ani v našem souboru pacientů tedy nedošlo k výraznému clusterování zlomů. U ALL pacientů byly ve více než polovině případů (9/16) nalezeny mikrohomologie, které nasvědčují vzniku zlomů pomocí NHEJ, nikoliv s využitím RAG rekombináz, jak naznačil Score a jeho spolupracovníci (Score, *et al* 2010). Celkové výsledky ukazující na zastoupení mikrohomologií, repetitivních sekvencí a kryptických RSS sekvencí však nejsou příliš jednoznačné. Na jejich základě není prakticky možné zodpovědně vyloučit či potvrdit konkrétní mechanismus vzniku zlomu u BCR/ABL-pozitivních leukémií.

10 Závěr

Podařilo se nám – jako jedné z mála světových laboratoří - optimalizovat metodu LD-PCR pro hledání BCR/ABL zlomů na genomické úrovni a dosáhnout vysoké úspěšnosti při hledání intronového přechodu fúze mezi geny BCR a ABL – u Major i minor pacientů s dostatkem diagnostického materiálu jsme zlom našli u 80% (8/10 respektive 12/15 pacientů), u dalších dvou pacientů jsme dosáhli specifické amplifikace v LD-PCR, ale zatím se nám nepodařilo osekvenovat přesné místo zlomu.

Naše výsledky ukázaly, že metoda stanovení MRN na základě nalezení přechodové sekvence BCR/ABL na genomické úrovni je účinná a v praxi přínosná. Nevýhodou této metody je pouze technická náročnost hledání zlomu, která pravděpodobně zabrání jejímu standardnímu zavedení do praxe. Nicméně takto získaná data mohou leccos naznačit o biologii leukémií a v budoucnu mohou mít i klinický význam. Biologicky především v tom smyslu, že – jak je zmíněno v úvodu – je stále nejasné, jak spolehlivě odlišit ALL a CML v lymfoblastické krizi. Vzhledem k tomu, že tyto diagnostické jednotky se léčí různě, bylo by nanejvýš vítané, kdyby naše práce navazující na tuto studii přinesla alespoň nějaké odpovědi, což je, jak doufáme, nyní reálné. Z klinického pohledu je pak samozřejmě klíčové, jak pacienty s tímto onemocněním monitorovat a jaké hladiny naměřené jednotlivými metodickými přístupy jsou relevantní a zasluhují například léčebnou intervenci (viz dále).

Podařilo se nám analyzovat a porovnat dosud největší soubor pacientů s akutní lymfoblastickou leukémií, podobné výsledky zatím nebyly prezentovány. Zavedení této metodiky v budoucnu využijeme v rámci mezinárodní spolupráce na protokolu pro léčbu dětí s BCR/ABL-pozitivní ALL EsPhALL. Naše pracovní skupina se účastní analýzy výsledků monitorování minimální reziduální nemoci (všichni pacienti jsou vyšetřováni metodou kvantifikace Ig/TCR a transkriptu BCR/ABL). Podle schváleného postupu budeme nyní z této velké celoevropské skupiny pacientů vybírat ty, u nichž tyto dvě metody nekorelují, a doplníme u nich právě vyšetření hladin BCR/ABL na gDNA úrovni – jak v celkové populaci, tak na sortovaných buňkách, abychom odhalili postižení jednotlivých hematopoetických řad. Vzhledem k širokému rozsahu studie EsPhALL se nám tedy podaří získat větší množství dat, která nám umožní statisticky spolehlivější analýzu. Prohloubením poznatků o postižení vývojových linií bychom mohli přispět k poznání rozdílu mezi ALL a CML v blastické krizi, které stále zůstává nejasné. Tato studie může mít v budoucnu

významný vliv na monitorování a léčbu těchto pacientů, kteří mají stále, i v éře kinázových inhibitorů, neuspokojivou prognózu.

11 Seznam použité literatury

- Adler, R., Viehmann, S., Kuhlisch, E., Martiniak, Y., Rottgers, S., Harbott, J. & Suttorp, M. (2009) Correlation of BCR/ABL transcript variants with patients' characteristics in childhood chronic myeloid leukaemia. *Eur J Haematol*, **82**, 112-118.
- An, X., Tiwari, A.K., Sun, Y., Ding, P.R., Ashby, C.R., Jr. & Chen, Z.S. (2010) BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors in the treatment of Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia: a review. *Leuk Res*, **34**, 1255-1268.
- Arico, M., Valsecchi, M.G., Camitta, B., Schrappe, M., Chessells, J., Baruchel, A., Gaynon, P., Silverman, L., Janka-Schaub, G., Kamps, W., Pui, C.H. & Masera, G. (2000) Outcome of treatment in children with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*, **342**, 998-1006.
- Baccarani, M., Cortes, J., Pane, F., Niederwieser, D., Saglio, G., Apperley, J., Cervantes, F., Deininger, M., Gratwohl, A., Guilhot, F., Hochhaus, A., Horowitz, M., Hughes, T., Kantarjian, H., Larson, R., Radich, J., Simonsson, B., Silver, R.T., Goldman, J. & Hehlmann, R. (2009) Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. (Abstract) *J Clin Oncol*, **27**, 6041-6051.
- Baccarani, M., Deininger, M.W., Rosti, G., Hochhaus, A., Soverini, S., Apperley, J.F., Cervantes, F., Clark, R.E., Cortes, J.E., Guilhot, F., Hjorth-Hansen, H., Hughes, T.P., Kantarjian, H.M., Kim, D.W., Larson, R.A., Lipton, J.H., Mahon, F.X., Martinelli, G., Mayer, J., Muller, M.C., Niederwieser, D., Pane, F., Radich, J.P., Rousselot, P., Saglio, G., Saussele, S., Schiffer, C., Silver, R., Simonsson, B., Steegmann, J.L., Goldman, J.M. & Hehlmann, R. (2013) European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood*, **122**, 872-884.
- Bartley, P.A., Ross, D.M., Latham, S., Martin-Harris, M.H., Budgen, B., Wilczek, V., Branford, S., Hughes, T.P. & Morley, A.A. (2010) Sensitive detection and quantification of minimal residual disease in chronic myeloid leukaemia using nested quantitative PCR for BCR-ABL DNA. *Int J Lab Hematol*, **32**, e222-228.
- Bedi, A., Zehnbaauer, B.A., Collector, M.I., Barber, J.P., Zicha, M.S., Sharkis, S.J. & Jones, R.J. (1993) BCR-ABL gene rearrangement and expression of primitive hematopoietic progenitors in chronic myeloid leukemia. *Blood*, **81**, 2898-2902.
- Beillard, E., Pallisgaard, N., van der Velden, V.H., Bi, W., Dee, R., van der Schoot, E., Delabesse, E., Macintyre, E., Gottardi, E., Saglio, G., Watzinger, F., Lion, T., van Dongen, J.J., Hokland, P. & Gabert, J. (2003) Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. *Leukemia*, **17**, 2474-2486.
- Biondi, A., Schrappe, M., De Lorenzo, P., Castor, A., Lucchini, G., Gandemer, V., Pieters, R., Stary, J., Escherich, G., Campbell, M., Li, C.K., Vora, A., Arico, M., Rottgers, S., Saha, V. & Valsecchi, M.G. (2012) Imatinib after induction for treatment of children and adolescents with Philadelphia-chromosome-positive acute

- lymphoblastic leukaemia (EsPhALL): a randomised, open-label, intergroup study. *Lancet Oncol*, **13**, 936-945.
- Bohm, A., Herrmann, H., Mitterbauer-Hohendanner, G., Hauswirth, A.W., Rabitsch, W., Mitterbauer, M., Sperr, W.R., Kalhs, P., Jager, U. & Valent, P. (2011) Stable non-transforming minimal residual disease in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia after autologous transplantation: origin from neoplastic yet 'pre-leukemic' stem cells? *Leuk Lymphoma*, **52**, 842-848.
- Brazier, R.M., Launder, T.M., Druker, B.J., Olson, S.B., Magenis, R.E., Mauro, M.J., Sawyers, C.L., Paquette, R.L. & O'Dwyer, M.E. (2002) Hematopathologic and cytogenetic findings in imatinib mesylate-treated chronic myelogenous leukemia patients: 14 months' experience. *Blood*, **100**, 435-441.
- Bruggemann, M., Raff, T., Flohr, T., Gokbuget, N., Nakao, M., Droese, J., Luschen, S., Pott, C., Ritgen, M., Scheuring, U., Horst, H.A., Thiel, E., Hoelzer, D., Bartram, C.R. & Kneba, M. (2006) Clinical significance of minimal residual disease quantification in adult patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, **107**, 1116-1123.
- Burke, M.J., Lindgen, B. & Verneris, M.R. (2012) Treatment of relapsed acute lymphoblastic leukemia: approaches used by pediatric oncologists and bone marrow transplant physicians. *Pediatr Blood Cancer*, **58**, 840-845.
- Burmeister, T., Groger, D., Kuhn, A., Hoelzer, D., Thiel, E. & Reinhardt, R. (2011) Fine structure of translocation breakpoints within the major breakpoint region in BCR-ABL1-positive leukemias. *DNA Repair (Amst)*, **10**, 1131-1137.
- Castor, A., Nilsson, L., Astrand-Grundstrom, I., Buitenhuis, M., Ramirez, C., Anderson, K., Strombeck, B., Garwicz, S., Bekassy, A.N., Schmiegelow, K., Lausen, B., Hokland, P., Lehmann, S., Juliusson, G., Johansson, B. & Jacobsen, S.E. (2005) Distinct patterns of hematopoietic stem cell involvement in acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med*, **11**, 630-637.
- Cazzaniga, G., Lanciotti, M., Rossi, V., Di Martino, D., Arico, M., Valsecchi, M.G., Basso, G., Masera, G., Micalizzi, C. & Biondi, A. (2002) Prospective molecular monitoring of BCR/ABL transcript in children with Ph+ acute lymphoblastic leukaemia unravels differences in treatment response. *Br J Haematol*, **119**, 445-453.
- Cortes, J.E., Talpaz, M., O'Brien, S., Faderl, S., Garcia-Manero, G., Ferrajoli, A., Verstovsek, S., Rios, M.B., Shan, J. & Kantarjian, H.M. (2006) Staging of chronic myeloid leukemia in the imatinib era: an evaluation of the World Health Organization proposal. *Cancer*, **106**, 1306-1315.
- Cuneo, A., Balboni, M., Piva, N., Carli, M.G., Tomasi, P., Previati, R., Negrini, M., Scapoli, G., Spanedda, R. & Castoldi, G. (1994) Lineage switch and multilineage involvement in two cases of pH chromosome-positive acute leukemia: evidence for a stem cell disease. *Haematologica*, **79**, 76-82.
- de Labarthe, A., Rousselot, P., Huguet-Rigal, F., Delabesse, E., Witz, F., Maury, S., Rea, D., Cayuela, J.M., Vekemans, M.C., Reman, O., Buzyn, A., Pigneux, A., Escoffre, M., Chalandon, Y., MacIntyre, E., Lheritier, V., Vernant, J.P., Thomas, X., Ifrah, N. &

- Dombret, H. (2007) Imatinib combined with induction or consolidation chemotherapy in patients with de novo Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: results of the GRAAPH-2003 study. *Blood*, **109**, 1408-1413.
- Dombret, H., Gabert, J., Boiron, J.M., Rigal-Huguet, F., Blaise, D., Thomas, X., Delannoy, A., Buzyn, A., Bilhou-Nabera, C., Cayuela, J.M., Fenaux, P., Bourhis, J.H., Fegueux, N., Charrin, C., Boucheix, C., Lheritier, V., Esperou, H., MacIntyre, E., Vernant, J.P. & Fiere, D. (2002) Outcome of treatment in adults with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia--results of the prospective multicenter LALA-94 trial. *Blood*, **100**, 2357-2366.
- Faber, E., Muzik, J., Koza, V., Demeckova, E., Voglova, J., Demitrovicova, L., Chudej, J., Markuljak, I., Cmunt, E., Kozak, T., Tothova, E., Jarosova, M., Dusek, L. & Indrak, K. (2011) Treatment of consecutive patients with chronic myeloid leukaemia in the cooperating centres from the Czech Republic and the whole of Slovakia after 2000--a report from the population-based CAMELIA Registry. *Eur J Haematol*, **87**, 157-168.
- Flohr, T., Schrauder, A., Cazzaniga, G., Panzer-Grumayer, R., van der Velden, V., Fischer, S., Stanulla, M., Basso, G., Niggli, F.K., Schafer, B.W., Sutton, R., Koehler, R., Zimmermann, M., Valsecchi, M.G., Gadner, H., Masera, G., Schrappe, M., van Dongen, J.J., Biondi, A. & Bartram, C.R. (2008) Minimal residual disease-directed risk stratification using real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the international multicenter trial AIEOP-BFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, **22**, 771-782.
- Gabert, J., Beillard, E., van der Velden, V.H., Bi, W., Grimwade, D., Pallisgaard, N., Barbany, G., Cazzaniga, G., Cayuela, J.M., Cave, H., Pane, F., Aerts, J.L., De Micheli, D., Thirion, X., Pradel, V., Gonzalez, M., Viehmann, S., Malec, M., Saglio, G. & van Dongen, J.J. (2003) Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. *Leukemia*, **17**, 2318-2357.
- Hochhaus, A., O'Brien, S.G., Guilhot, F., Druker, B.J., Branford, S., Foroni, L., Goldman, J.M., Muller, M.C., Radich, J.P., Rudoltz, M., Mone, M., Gathmann, I., Hughes, T.P. & Larson, R.A. (2009) Six-year follow-up of patients receiving imatinib for the first-line treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia*, **23**, 1054-1061.
- Chen, H., Liu, K.Y., Xu, L.P., Liu, D.H., Chen, Y.H., Zhao, X.Y., Han, W., Zhang, X.H., Wang, Y., Zhang, Y.Y., Qin, Y.Z., Liu, Y.R. & Huang, X.J. (2012) Administration of imatinib after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation may improve disease-free survival for patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *J Hematol Oncol*, **5**, 29.
- Inukai, T., Sugita, K., Suzuki, T., Ijima, K., Goi, K., Tezuka, T., Kojika, S., Hatakeyama, K., Kagami, K., Mori, T. & et al. (1993) A novel 203 kD aberrant BCR-ABL product in a girl with Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukaemia. (Abstract) *Br J Haematol*, **85**, 823-825.

- Jaso, J., Thomas, D.A., Cunningham, K., Jorgensen, J.L., Kantarjian, H.M., Medeiros, L.J. & Wang, S.A. (2011) Prognostic significance of immunophenotypic and karyotypic features of Philadelphia positive B-lymphoblastic leukemia in the era of tyrosine kinase inhibitors. *Cancer*, **117**, 4009-4017.
- Jeffs, A.R., Benjes, S.M., Smith, T.L., Sowerby, S.J. & Morris, C.M. (1998) The BCR gene recombines preferentially with Alu elements in complex BCR-ABL translocations of chronic myeloid leukaemia. *Hum Mol Genet*, **7**, 767-776.
- Kantarjian, H.M., Cortes, J., O'Brien, S., Giles, F.J., Albitar, M., Rios, M.B., Shan, J., Faderl, S., Garcia-Manero, G., Thomas, D.A., Resta, D. & Talpaz, M. (2002a) Imatinib mesylate (STI571) therapy for Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in blast phase. *Blood*, **99**, 3547-3553.
- Kantarjian, H.M., O'Brien, S., Cortes, J.E., Smith, T.L., Rios, M.B., Shan, J., Yang, Y., Giles, F.J., Thomas, D.A., Faderl, S., Garcia-Manero, G., Jeha, S., Wierda, W., Issa, J.P., Kornblau, S.M., Keating, M., Resta, D., Capdeville, R. & Talpaz, M. (2002b) Treatment of philadelphia chromosome-positive, accelerated-phase chronic myelogenous leukemia with imatinib mesylate. *Clin Cancer Res*, **8**, 2167-2176.
- Kerst, G., Kreyenberg, H., Roth, C., Well, C., Dietz, K., Coustan-Smith, E., Campana, D., Koscielniak, E., Niemeyer, C., Schlegel, P.G., Muller, I., Niethammer, D. & Bader, P. (2005) Concurrent detection of minimal residual disease (MRD) in childhood acute lymphoblastic leukaemia by flow cytometry and real-time PCR. *Br J Haematol*, **128**, 774-782.
- Knechtli, C.J.C., Goulden, N.J., Hancock, J.P., Grandage, V.L.G., Harris, E.L., Garland, R.J., Jones, C.G., Rowbottom, A.W., Hunt, L.P., Green, A.F., Clarke, E., Lankester, A.W., Cornish, J.M., Pamphilon, D.H., Steward, C.G. & Oakhill, A. (1998) Minimal Residual Disease Status Before Allogeneic Bone Marrow Transplantation Is an Important Determinant of Successful Outcome for Children and Adolescents With Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood*, **92**, 4072-4079.
- Krumbholz, M., Karl, M., Tauer, J.T., Thiede, C., Rascher, W., Suttorp, M. & Metzler, M. (2012) Genomic BCR-ABL1 breakpoints in pediatric chronic myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*, **51**, 1045-1053.
- Langerak, A.W., Wolvers-Tettero, I.L., van Gastel-Mol, E.J., Oud, M.E. & van Dongen, J.J. (2001) Basic helix-loop-helix proteins E2A and HEB induce immature T-cell receptor rearrangements in nonlymphoid cells. *Blood*, **98**, 2456-2465.
- Lee, S., Kim, D.W., Cho, B.S., Yoon, J.H., Shin, S.H., Yahng, S.A., Lee, S.E., Eom, K.S., Kim, Y.J., Chung, N.G., Kim, H.J., Min, C.K., Lee, J.W., Min, W.S. & Park, C.W. (2012) Impact of minimal residual disease kinetics during imatinib-based treatment on transplantation outcome in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, **26**, 2367-2374.
- Miller, S.A., Dykes, D. D. & Polesky, H. F. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl. Acid. Res*, **16**, 1215.
- Moorman, A.V., Harrison, C.J., Buck, G.A., Richards, S.M., Secker-Walker, L.M., Martineau, M., Vance, G.H., Cherry, A.M., Higgins, R.R., Fielding, A.K., Foroni, L.,

- Paietta, E., Tallman, M.S., Litzow, M.R., Wiernik, P.H., Rowe, J.M., Goldstone, A.H. & Dewald, G.W. (2007) Karyotype is an independent prognostic factor in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): analysis of cytogenetic data from patients treated on the Medical Research Council (MRC) UKALLXII/Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) 2993 trial. *Blood*, **109**, 3189-3197.
- Nacheva, E.P., Grace, C.D., Brazma, D., Gancheva, K., Howard-Reeves, J., Rai, L., Gale, R.E., Linch, D.C., Hills, R.K., Russell, N., Burnett, A.K. & Kottaridis, P.D. (2013) Does BCR/ABL1 positive acute myeloid leukaemia exist? *Br J Haematol*, **161**, 541-550.
- Neale, G.A., Coustan-Smith, E., Stow, P., Pan, Q., Chen, X., Pui, C.H. & Campana, D. (2004) Comparative analysis of flow cytometry and polymerase chain reaction for the detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, **18**, 934-938.
- Nowell, P.C. & Hungerford, D.A. (1960) A Minute Chromosome in Human Chronic Granulocytic Leukemia. *Science*.
- O'Brien, S., Thall, P.F. & Siciliano, M.J. (1997) Cytogenetics of chronic myelogenous leukaemia. *Baillieres Clin Haematol*, **10**, 259-276.
- O'Brien, S.G., Guilhot, F., Larson, R.A., Gathmann, I., Baccarani, M., Cervantes, F., Cornelissen, J.J., Fischer, T., Hochhaus, A., Hughes, T., Lechner, K., Nielsen, J.L., Rousselot, P., Reiffers, J., Saglio, G., Shepherd, J., Simonsson, B., Gratwohl, A., Goldman, J.M., Kantarjian, H., Taylor, K., Verhoef, G., Bolton, A.E., Capdeville, R. & Druker, B.J. (2003) Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, **348**, 994-1004.
- Pajor, L., Vass, J.A., Kereskai, L., Kajtar, P., Szomor, A., Egyed, M., Ivanyi, J. & Jakso, P. (2000) The existence of lymphoid lineage restricted Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia with heterogeneous bcr-abl rearrangement. *Leukemia*, **14**, 1122-1126.
- Pane, F., Cimino, G., Izzo, B., Camera, A., Vitale, A., Quintarelli, C., Picardi, M., Specchia, G., Mancini, M., Cuneo, A., Mecucci, C., Martinelli, G., Saglio, G., Rotoli, B., Mandelli, F., Salvatore, F. & Foa, R. (2005) Significant reduction of the hybrid BCR/ABL transcripts after induction and consolidation therapy is a powerful predictor of treatment response in adult Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, **19**, 628-635.
- Pane, F., Frigeri, F., Sindona, M., Luciano, L., Ferrara, F., Cimino, R., Meloni, G., Saglio, G., Salvatore, F. & Rotoli, B. (1996) Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker (BCR/ABL with C3/A2 junction). *Blood*, **88**, 2410-2414.
- Pfeifer, H., Goekbuget, N., Volp, C., Huttman, A., Lubbert, M., Stuhlmann, R., Dengler, J., Kreuzer, K.-A., Beck, J., Stelljes, M., Schmid, M., Wassmann, B., Leimer, L., Spiekermann, K., Terwey, T.H., Schafer-Eckart, K., Ditz, D., Lindemann, H., Morgner, A., Schaich, M., Burmeister, T., Binckebanck, A., Hoelzer, D. & Ottmann,

- O.G. (2010) Long-Term Outcome of 335 Adult Patients Receiving Different Schedules of Imatinib and Chemotherapy as Front-Line Treatment for Philadelphia-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia (Ph+ ALL). (Abstract) *ASH Annual Meeting Abstracts*, **116**, 173-.
- Ross, D.M., Branford, S., Moore, S. & Hughes, T.P. (2006) Limited clinical value of regular bone marrow cytogenetic analysis in imatinib-treated chronic phase CML patients monitored by RQ-PCR for BCR-ABL. *Leukemia*, **20**, 664-670.
- Ross, D.M., Branford, S., Seymour, J.F., Schwarzer, A.P., Arthur, C., Bartley, P.A., Slader, C., Field, C., Dang, P., Filshie, R.J., Mills, A.K., Grigg, A.P., Melo, J.V. & Hughes, T.P. (2010) Patients with chronic myeloid leukemia who maintain a complete molecular response after stopping imatinib treatment have evidence of persistent leukemia by DNA PCR. *Leukemia*, **24**, 1719-1724.
- Rowe, J.M., Buck, G., Burnett, A.K., Chopra, R., Wiernik, P.H., Richards, S.M., Lazarus, H.M., Franklin, I.M., Litzow, M.R., Ciobanu, N., Prentice, H.G., Durrant, J., Tallman, M.S. & Goldstone, A.H. (2005) Induction therapy for adults with acute lymphoblastic leukemia: results of more than 1500 patients from the international ALL trial: MRC UKALL XII/ECOG E2993. *Blood*, **106**, 3760-3767.
- Russo, D., Martinelli, G., Malagola, M., Skert, C., Soverini, S., Iacobucci, I., De Vivo, A., Testoni, N., Castagnetti, F., Gugliotta, G., Turri, D., Bergamaschi, M., Pregno, P., Pungolino, E., Stagno, F., Breccia, M., Martino, B., Intermesoli, T., Fava, C., Abruzzese, E., Tiribelli, M., Bigazzi, C., Cesana, B.M., Rosti, G. & Baccarani, M. (2013) Effects and outcome of a policy of intermittent imatinib treatment in elderly patients with chronic myeloid leukemia. *Blood*, **121**, 5138-5144.
- Score, J., Calasanz, M.J., Ottman, O., Pane, F., Yeh, R.F., Sobrinho-Simoes, M.A., Kreil, S., Ward, D., Hidalgo-Curtis, C., Melo, J.V., Wiemels, J., Nadel, B., Cross, N.C. & Grand, F.H. (2010) Analysis of genomic breakpoints in p190 and p210 BCR-ABL indicate distinct mechanisms of formation. *Leukemia*, **24**, 1742-1750.
- Schenk, T.M., Keyhani, A., Bottcher, S., Kliche, K.O., Goodacre, A., Guo, J.Q., Arlinghaus, R.B., Kantarjian, H.M. & Andreeff, M. (1998) Multilineage involvement of Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, **12**, 666-674.
- Scheuring, U.J., Pfeifer, H., Wassmann, B., Bruck, P., Gehrke, B., Petershofen, E.K., Gschaidmeier, H., Hoelzer, D. & Ottmann, O.G. (2003) Serial minimal residual disease (MRD) analysis as a predictor of response duration in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph+ALL) during imatinib treatment. *Leukemia*, **17**, 1700-1706.
- Schoch, C., Schnittger, S., Bursch, S., Gerstner, D., Hochhaus, A., Berger, U., Hehlmann, R., Hiddemann, W. & Haferlach, T. (2002) Comparison of chromosome banding analysis, interphase- and hypermetaphase-FISH, qualitative and quantitative PCR for diagnosis and for follow-up in chronic myeloid leukemia: a study on 350 cases. *Leukemia*, **16**, 53-59.

- Schrapppe, M., Arico, M., Harbott, J., Biondi, A., Zimmermann, M., Conter, V., Reiter, A., Valsecchi, M.G., Gadner, H., Basso, G., Bartram, C.R., Lampert, F., Riehm, H. & Masera, G. (1998) Philadelphia chromosome-positive (Ph+) childhood acute lymphoblastic leukemia: good initial steroid response allows early prediction of a favorable treatment outcome. *Blood*, **92**, 2730-2741.
- Schroeder, H.W., Jr. & Cavacini, L. (2010) Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol*, **125**, S41-52.
- Soekarman, D., van Denderen, J., Hoefsloot, L., Moret, M., Meeuwssen, T., van Baal, J., Hagemeijer, A. & Grosveld, G. (1990) A novel variant of the bcr-abl fusion product in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. (Abstract) *Leukemia*, **4**, 397-403.
- Soupir, C.P., Vergilio, J.A., Dal Cin, P., Muzikansky, A., Kantarjian, H., Jones, D. & Hasserjian, R.P. (2007) Philadelphia chromosome-positive acute myeloid leukemia: a rare aggressive leukemia with clinicopathologic features distinct from chronic myeloid leukemia in myeloid blast crisis. *Am J Clin Pathol*, **127**, 642-650.
- Sramkova, L., Muzikova, K., Fronkova, E., Krejci, O., Sedlacek, P., Formankova, R., Mejstrikova, E., Sary, J. & Trka, J. (2007) Detectable minimal residual disease before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation predicts extremely poor prognosis in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*, **48**, 93-100.
- Sary, J., Jabali, Y., Trka, J., Hrusak, O., Gajdos, P., Hrstkova, H., Sterba, J., Blazek, B., Hak, J., Prochazkova, D., Cerna, Z., Smisek, P., Sedlacek, P., Vavra, V., Mihal, V. & Hrodek, O. (2010) Long-term results of treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia in the Czech Republic. *Leukemia*, **24**, 425-428.
- Suttorp, M. & Millot, F. (2010) Treatment of pediatric chronic myeloid leukemia in the year 2010: use of tyrosine kinase inhibitors and stem-cell transplantation. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, **2010**, 368-376.
- van der Velden, V.H., Cazzaniga, G., Schrauder, A., Hancock, J., Bader, P., Panzer-Grumayer, E.R., Flohr, T., Sutton, R., Cave, H., Madsen, H.O., Cayuela, J.M., Trka, J., Eckert, C., Foroni, L., Zur Stadt, U., Beldjord, K., Raff, T., van der Schoot, C.E. & van Dongen, J.J. (2007) Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia*, **21**, 604-611.
- van der Velden, V.H., Wijkhuijs, J.M., Jacobs, D.C., van Wering, E.R. & van Dongen, J.J. (2002a) T cell receptor gamma gene rearrangements as targets for detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia by real-time quantitative PCR analysis. *Leukemia*, **16**, 1372-1380.
- van der Velden, V.H.J., Willemse, M.J., van der Schoot, C.E., Hahlen, K., van Wering, E.R. & van Dongen, J.J.M. (2002b) Immunoglobulin kappa deleting element rearrangements in precursor-B acute lymphoblastic leukemia are stable targets for detection of minimal residual disease by real-time quantitative PCR. *Leukemia*, **16**, 928-936.

- van Dongen, J.J., Langerak, A.W., Bruggemann, M., Evans, P.A., Hummel, M., Lavender, F.L., Delabesse, E., Davi, F., Schuurin, E., Garcia-Sanz, R., van Krieken, J.H., Droese, J., Gonzalez, D., Bastard, C., White, H.E., Spaargaren, M., Gonzalez, M., Parreira, A., Smith, J.L., Morgan, G.J., Kneba, M. & Macintyre, E.A. (2003) Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*, **17**, 2257-2317.
- van Dongen, J.J., Macintyre, E.A., Gabert, J.A., Delabesse, E., Rossi, V., Saglio, G., Gottardi, E., Rambaldi, A., Dotti, G., Griesinger, F., Parreira, A., Gameiro, P., Diaz, M.G., Malec, M., Langerak, A.W., San Miguel, J.F. & Biondi, A. (1999) Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia*, **13**, 1901-1928.
- van Rhee, F., Hochhaus, A., Lin, F., Melo, J.V., Goldman, J.M. & Cross, N.C. (1996) p190 BCR-ABL mRNA is expressed at low levels in p210-positive chronic myeloid and acute lymphoblastic leukemias. *Blood*, **87**, 5213-5217.
- Verhagen, O.J., Willemse, M.J., Breunis, W.B., Wijkhuijs, A.J., Jacobs, D.C., Joosten, S.A., van Wering, E.R., van Dongen, J.J. & van der Schoot, C.E. (2000) Application of germline IGH probes in real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, **14**, 1426-1435.
- Virgili, A., Brazma, D., Reid, A.G., Howard-Reeves, J., Valganon, M., Chanalaris, A., De Melo, V.A., Marin, D., Apperley, J.F., Grace, C. & Nacheva, E.P. (2008) FISH mapping of Philadelphia negative BCR/ABL1 positive CML. *Mol Cytogenet*, **1**, 14.
- Waller, C.F., Dennebaum, G., Feldmann, C. & Lange, W. (1999) Long-template DNA polymerase chain reaction for the detection of the bcr/abl translocation in patients with chronic myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res*, **5**, 4146-4151.
- Wassmann, B., Pfeifer, H., Stadler, M., Bornhauser, M., Bug, G., Scheuring, U.J., Bruck, P., Stelljes, M., Schwerdtfeger, R., Basara, N., Perz, J., Bunjes, D., Ledderose, G., Mahlberg, R., Binckebanck, A., Gschaidmeier, H., Hoelzer, D. & Ottmann, O.G. (2005) Early molecular response to posttransplantation imatinib determines outcome in MRD+ Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph+ ALL). *Blood*, **106**, 458-463.
- Weerkamp, F., Dekking, E., Ng, Y.Y., van der Velden, V.H.J., Wai, H., Bottcher, S., Bruggemann, M., van der Sluijs, A.J., Koning, A., Boeckx, N., Van Poecke, N., Lucio, P., Mendonca, A., Sedek, L., Szczepanski, T., Kalina, T., Kovac, M., Hoogeveen, P.G., Flores-Montero, J., Orfao, A., Macintyre, E., Lhermitte, L., Chen, R., Brouwer-De Cock, K.A.J., van der Linden, A., Noordijk, A.L., Comans-Bitter, W.M., Staal, F.J.T. & van Dongen, J.J.M. (2009) Flow cytometric immunobead assay for the detection of BCR-ABL fusion proteins in leukemia patients. *Leukemia*, **23**, 1106-1117.

- Yanada, M., Sugiura, I., Takeuchi, J., Akiyama, H., Maruta, A., Ueda, Y., Usui, N., Yagasaki, F., Yujiri, T., Takeuchi, M., Nishii, K., Kimura, Y., Miyawaki, S., Narimatsu, H., Miyazaki, Y., Ohtake, S., Jinnai, I., Matsuo, K., Naoe, T. & Ohno, R. (2008) Prospective monitoring of BCR-ABL1 transcript levels in patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia undergoing imatinib-combined chemotherapy. *Br J Haematol*, **143**, 503-510.
- Yanada, M., Takeuchi, J., Sugiura, I., Akiyama, H., Usui, N., Yagasaki, F., Kobayashi, T., Ueda, Y., Takeuchi, M., Miyawaki, S., Maruta, A., Emi, N., Miyazaki, Y., Ohtake, S., Jinnai, I., Matsuo, K., Naoe, T. & Ohno, R. (2006) High complete remission rate and promising outcome by combination of imatinib and chemotherapy for newly diagnosed BCR-ABL-positive acute lymphoblastic leukemia: a phase II study by the Japan Adult Leukemia Study Group. *J Clin Oncol*, **24**, 460-466.
- Zaliova, M., Fronkova, E., Krejcikova, K., Muzikova, K., Mejstrikova, E., Stary, J., Trka, J. & Zuna, J. (2009) Quantification of fusion transcript reveals a subgroup with distinct biological properties and predicts relapse in BCR/ABL-positive ALL: implications for residual disease monitoring. *Leukemia*, **23**, 944-951.
- Zhang, J.G., Goldman, J.M. & Cross, N.C. (1995) Characterization of genomic BCR-ABL breakpoints in chronic myeloid leukaemia by PCR. (Abstract) *Br J Haematol*, **90**, 138-146.